

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19790179

研究課題名 (和文)

飽和脂肪酸による脂肪組織浸潤性マクロファージの活性化機序とインスリン抵抗性

研究課題名 (英文)

Cbl-b down-regulates fatty acid-mediated macrophage activation and peripheral insulin resistance

研究代表者

平坂 勝也 (HIRASAKA KATSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスパイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70432747

研究成果の概要：

肥満によって脂肪組織ではマクロファージの浸潤が増加し、慢性的な軽度の炎症反応を引き起こす。これまでの我々の研究において、30週齢のユビキチンリガーゼ Cbl-b 遺伝子欠損マウスの脂肪組織ではマクロファージの浸潤や活性化が認められ、インスリン抵抗性を引き起こすことを報告した。近年、マクロファージの活性化因子として脂肪酸が注目されている。そこで、本研究では、Cbl-b を介した、脂肪酸によるマクロファージ活性化機構について検討した。

Cbl-b 遺伝子欠損マウスに飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食を負荷し、それによるサイトカインシグナル及びインスリン抵抗性への影響を検討した結果、Cbl-b 遺伝子欠損マウスにおける脂肪組織では、野生型マウスに比べてマクロファージの浸潤が早期に見られ、サイトカイン発現上昇やアディポカイン発現異常がみられた。Cbl-b 遺伝子欠損マウスの血中では MCP-1 の増大が認められ、それが脂肪組織へのマクロファージ浸潤増大を引き起こしたと考えられる。さらに、長期間の高脂肪食負荷は Cbl-b 遺伝子欠損マウスの脂肪組織及び骨格筋における Akt のリン酸化の減弱及び脂肪肝を引き起こした。以上の知見より、Cbl-b が飽和脂肪酸によるマクロファージ活性化に関与し、インスリン抵抗性の発症機構に寄与することが示唆された。このように、Cbl-b は食事性肥満におけるインスリン抵抗性治療の重要な分子ターゲットになりうると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：マクロファージ、飽和脂肪酸、ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満は、糖尿病などのメタボリックシンドロームの発症原因のひとつである。近年の研究の発展により、糖尿病患者では、脂肪細胞自身ではなく、脂肪組織に浸潤するマクロファージが腫瘍壊死因子(TNF- α)やインターロイキン-6(IL-6)を分泌し、その結果全身性の耐糖能異常やインスリン抵抗性を惹起するというシナリオが提唱されている。しかしながら、なぜ内臓脂肪型肥満の脂肪組織にはマクロファージが浸潤し、活性化するのは全くわかっていない。申請者らは、これまで JAXA(日本宇宙航空研究開発機構)と共同で、寝たきり(Unloading)や加齢による筋萎縮の原因として筋組織への免疫細胞(主にマクロファージ)の浸潤に関する研究を行ってきた。その研究の中から、ユビキチン依存性蛋白質分解経路がマクロファージの活性化を制御していることを見出した。興味深いことに、免疫系細胞のユビキチン依存性分解経路の律速酵素である Cbl-b ユビキチン連結酵素)の活性を阻害すると、マクロファージが脂肪組織に著明に浸潤することがわかった。これらの知見は、マクロファージの Cbl-b を介したユビキチン依存性蛋白質分解経路が糖尿病の発症に重要な役割を担っていることを強く示唆した。実際、高脂肪食を摂取した糖尿病モデル動物のマクロファージの Cbl-b 発現を解析すると正常動物の約 20%までその発現が低下していた。

本研究では、Cbl-b ユビキチン連結酵素によるユビキチン化システムを介したマクロファージの活性化と浸潤が、インスリン抵抗性の獲得に重要な働きをしていることを実証する。

2. 研究の目的

インスリン抵抗性は II 型糖尿病における中心的な病態であり、その主な原因の一つとして肥満、特に内臓脂肪型肥満が知られている。肥満によるインスリン抵抗性は II 型糖尿病だけでなく高血圧、脂質代謝異常などの病態が重複したメタボリックシンドロームも引き起こす。近年、その基盤病態として脂肪組織における慢性的な軽度の炎症反応が注目されている。脂肪組織は脂肪細胞からなる脂肪細胞画分 adipocyte fraction (AF) だけでなく内皮細胞、脂肪前駆細胞、白血球、マクロファージなどから成る非成熟脂肪細胞画分 stromal vascular fraction (SVF) が含まれている。特に、肥満の脂肪組織にはマクロファージの浸潤が増加することが報告されており、このことが脂肪組織における炎症性変化を誘発すると考えられている。浸潤が起こった脂肪組織では TNF- α や IL-6、MCP-1 などのサイトカイン産生が亢進する。これらのサイトカインの亢進は直接的ある

いは間接的に脂肪組織や筋肉、肝臓などのインスリン感受性組織に作用し、インスリン抵抗性の原因となる。しかしながら、肥満の脂肪組織で顕著に見られるマクロファージ浸潤や活性化機構は未だ明らかになっていない。

Cbl-b はマクロファージや T 細胞の成熟、活性化に関与するユビキチンリガーゼである。Cbl-b はマクロファージ由来細胞株の HL60、U930 が単球からマクロファージへと分化する際に発現が増大する遺伝子として見出された。これまでの我々の研究において、Cbl-b 遺伝子欠損の脂肪組織ではマクロファージの浸潤や活性化が認められ、インスリン抵抗性が引き起こされることを報告した。即ち、マクロファージの活性化には Cbl-b が重要な働きをしている。これまで、Cbl-b の機能は T 細胞や B 細胞、肥満細胞、好中球などで詳細に検討されているが、マクロファージでの機能についてはほとんどわかっていない。

近年、飽和脂肪酸によるマクロファージの活性化が注目されている。実際に、肥満動物の血中では遊離脂肪酸が増大する。遊離脂肪酸(特に飽和脂肪酸)はマクロファージに発現している Toll like receptor 4 (TLR4)と結合し、細胞内にシグナルが伝わることによって、NF κ B シグナル経路を介してサイトカインの発現を上昇させる。TLR4 シグナルの下流にはサイトカイン産生に重要な分子である MyD88 や NF κ B シグナル経路、MAPK ファミリーが存在する。近年、TLR やその下流にある MyD88 は Cbl-b と結合することが報告された。そこで、我々は Cbl-b がこのサイトカインシグナル経路を制御していると仮定した。

本研究は、飽和脂肪酸によるマクロファージ活性化のメカニズムを明らかにすることを目的としている。Cbl-b 遺伝子欠損マウスは高脂肪食負荷早期に脂肪組織浸潤が認められ、野生型マウスと比較し血中の MCP-1 の上昇が認められた。その結果、顕著なインスリン抵抗性を示した。さらに、Cbl-b が飽和脂肪酸によるサイトカインシグナル経路を負に調節していることが示唆された。我々の知見は、Cbl-b がマクロファージ活性化によって引き起こされるインスリン抵抗性を伴った食事性肥満において重要な分子の 1 つであることを示す。

3. 研究の方法

【Cbl-b 遺伝子欠損マウス】

Hua Gu 博士より供与された Cbl-b 遺伝子欠損マウスは、Cbl-b 遺伝子の 3 番エクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子を挿入することによって作成したものである。C57BL/6J マウスと 8 世代バッククロスし、

らの高脂肪食摂取期間においても野生型マウスに比べ、Cbl-b 遺伝子欠損マウスでは脂肪組織への増大した免疫細胞浸潤が観察された (Fig. 1A)。この細胞がマクロファージ様の細胞であることを確認するために、免疫染色を行ったところ、その細胞は F4/80 ポジティブなマクロファージ様の細胞であった (Fig. 1A)。これらの現象を定量化するために、野生型マウス及び Cbl-b 遺伝子欠損マウスの脂肪組織におけるマクロファージマーカー (F4/80、CD11b) に対する抗体を用いたフローサートメーターによる解析を行った。早期 (5 週間) の高脂肪食摂取において、野生型マウスに比べ、Cbl-b 遺伝子欠損マウスの脂肪組織では F4/80、CD11b ダブルポジティブであるマクロファージ様の細胞が約 5 倍有意に浸潤していた (Fig. 1B)。一方、長期 (18 週間) の高脂肪食摂取において、野生型マウスに比べ、Cbl-b 遺伝子欠損マウスの脂肪組織では F4/80、CD11b ダブルポジティブであるマクロファージ様の細胞が約 20% 少なかった (Fig. 1B)。

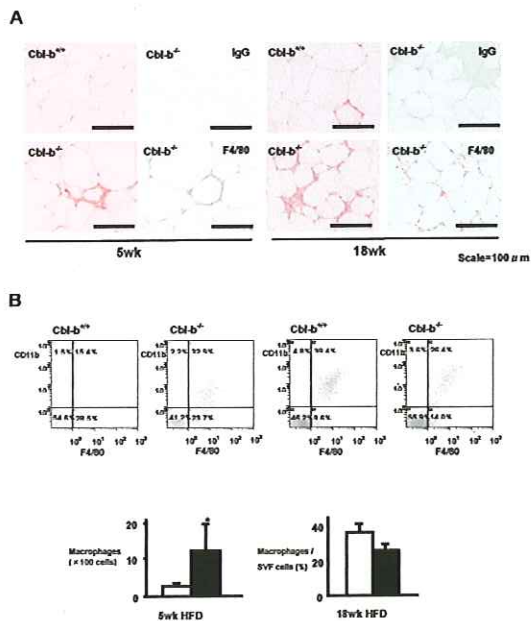


Fig. 1 高脂肪食による脂肪組織の炎症性変化

【5 週間の高脂肪食摂取によるサイトカインシグナルへの影響】

高脂肪食による Cbl-b 遺伝子欠損マウスの脂肪組織へのマクロファージ早期浸潤がサイトカインの発現や分泌に影響を及ぼすかを検討するために、脂肪組織におけるサイトカインの発現及び血中におけるサイトカイン蛋白質量を測定した。野生型マウスに比べ、Cbl-b 遺伝子欠損マウスでは脂肪組織における IL-6、TNF- α 、MCP-1、F4/80 の mRNA 発現量がそれぞれ約 1.5、1.5、3、2 倍増大していた (Fig. 2A)。またアディポカインについて、野生型マウスに比べ、Cbl-b 遺伝子欠損

マウスではレプチンの mRNA 発現量に有意な差は見られなかったがアディポネクチンの mRNA 発現量は減少していた (Fig. 2A)。

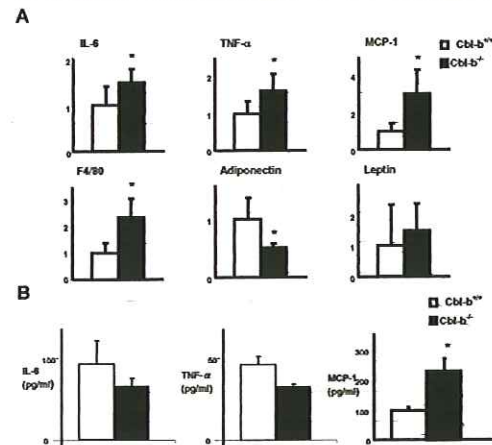


Fig. 2 5週間の高脂肪食摂取によるサイトカインシグナルへの影響

Cbl-b 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べ、血中の TNF- α 及び IL-6 蛋白質量に有意な差は見られなかったが、MCP-1 蛋白質量は約 2 倍増大していた (Fig. 2B)。

【高脂肪食によるインスリンシグナルの影響】

脂肪組織における炎症性変化はインスリン感受性組織である脂肪組織や肝臓、骨格筋に影響し、インスリンシグナルを減弱させる。Cbl-b 遺伝子欠損が高脂肪食によるインスリンシグナル系に影響するかどうかを検討す

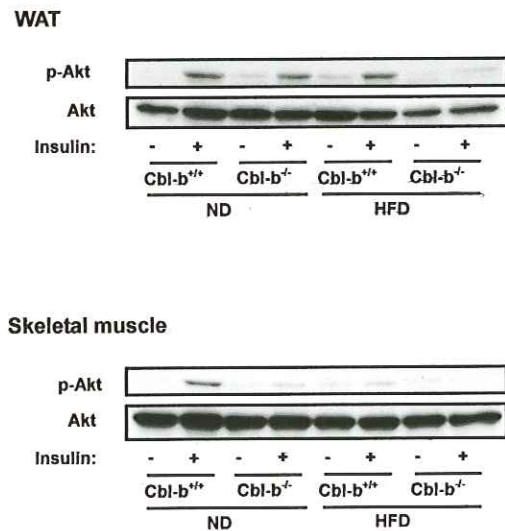


Fig. 3 高脂肪食によるインスリンシグナルの影響

るために、野生型マウス及び Cbl-b 遺伝子欠損マウスの白色脂肪組織、肝臓、骨格筋を用いて、インスリンシグナル系のひとつであるインスリン投与による Akt のリン酸化を検討した。脂肪組織において、普通食摂取野生型マウス及び Cbl-b 遺伝子欠損マウスでは Akt

のリン酸化が見られたが、Cbl-b 遺伝子欠損マウスの骨格筋においてリン酸化の減弱が見られた (Fig. 3)。一方、高脂肪食負荷では Cbl-b 遺伝子欠損マウスの脂肪組織及び骨格筋において、野生型マウスに比べ、Akt のリン酸化が減弱していた (Fig. 3)。肝臓での Akt のリン酸化からは、肝臓でインスリン抵抗性が生じているかどうかを判断できなかった (データは示さず)。

【高脂肪食による肝臓への影響】

肝臓でのインスリン抵抗性を再検討するために、5 週間高脂肪食を摂取した野生型マウス及び Cbl-b 遺伝子欠損マウスの肝臓において、糖新生に関与するグルコース-6-ホスファターゼ(G6Pase)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)及び脂肪合成に関与する SREBP-1c の mRNA 発現量について検討した。Cbl-b 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べて 5、18 週間のどちらの高脂肪食摂取期間においても G6Pase の発現がそれぞれ約 30、50%減少し、5 週間の高脂肪食摂取において SREBP-1c の発現が約 3 倍増大していた (Fig. 4A)。さらに脂肪肝が生じているかどうかを検討するためにオイルレッド O 染色を行った。18 週間の高脂肪食負荷により脂肪油滴の増加が認められ、Cbl-b 遺伝子欠損マウスでは顕著な脂肪肝が生じていた (Fig. 4B)。興味深いことに、Cbl-b 遺

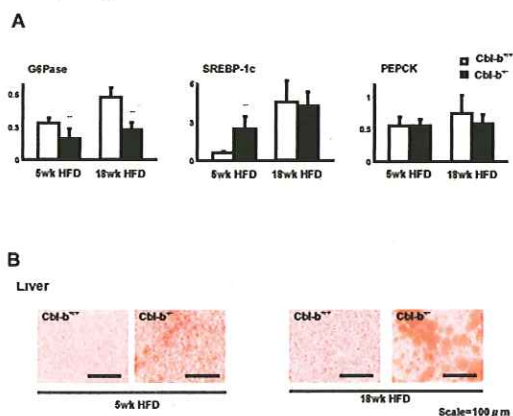


Fig. 4 高脂肪食による肝臓への影響

伝子欠損マウスでは 5 週間の高脂肪食負荷においても脂肪肝が観察された (Fig. 4B)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

- ① Nishimura M, Mikura M, Hirasaka K, Okumura Y, Nikawa T, Kawano Y, Nakayama M, Ikeda M. Effects of Dimethyl Sulphoxide and Dexamethasone on mRNA Expression of Myogenesis- and Muscle Proteolytic System-related Genes in Mouse Myoblastic C2C12 Cells. *J Biochem*, 44(6):717-724, 2008, 査読

- 有
- ② Hirasaka K, Tokuoka K, Nakao R, Yamada C, Oarada M, Imagawa T, Ishidoh K, Okumura Y, Kishi K, Nikawa T. Cathepsin C propeptide interacts with intestinal alkaline phosphatase and heat shock cognate protein 70 in human Caco-2 cells. *J Phys Sci*, 58(2):105-111, 2008, 査読有
- ③ Nakae Y, Hirasaka K, Goto J, Nikawa T, Shono M, Yoshida M, Stoward PJ. Subcutaneous injection, from birth, of epigallocatechin-3-gallate, a component of green tea, limits the onset of muscular dystrophy in mdx mice: a quantitative histological, immunohistochemical and electrophysiological study. *Histochem Cell Biol*, 129(4):489-501, 2008, 査読有
- ④ Oarada M, Tsuzuki T, Gono T, Igarashi M, Kamei K, Nikawa T, Hirasaka K, Ogawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Kurita N. Effects of dietary fish oil on lipid peroxidation and serum triacylglycerol levels in psychologically stressed mice. *Nutrition*, 24(1):67-75, 2008, 査読有
- ⑤ Kawahara Y, Nikawa T, Hirasaka K, Miyashita T, Kataoka K, Yuge L. Preventive Effect of Isometric Contraction Exercise on Disuse Muscle Atrophy Using Tail Suspension Mice. *J Phys Ther Sci*, 20: 39-44, 2008, 査読有
- ⑥ Furochi H, Tamura S, Mameoka M, Yamada C, Ogawa T, Hirasaka K, Okumura Y, Imagawa T, Oguri S, Ishidoh K, Kishi K, Higashiyama S, Nikawa T. Osteoactivin fragments produced by ectodomain shedding induce MMP-3 expression via ERK pathway in mouse NIH-3T3 fibroblasts. *FEBS Lett*, 581(30):5743-5750, 2007, 査読有
- ⑦ Hirasaka K, Kohno S, Goto J, Furochi H, Mawatari K, Harada N, Hosaka T, Nakaya Y, Ishidoh K, Obata T, Ebina Y, Gu H, Takeda S, Kishi K, Nikawa T: Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice. *Diabetes*, 56(10):2511-2522, 2007, 査読有
- ⑧ Nakao R, Ozaki E, Hasegawa M, Kondo A, Uezu K, Hirasaka K, Nikawa T, Kishi K: Distinct effects of the lateral

hypothalamus and anterior pyriform cortex destructions on protein intake in rats. *J Med Invest*, 54(3-4):255-260, 2007, 査読有

- ⑨ Furochi H, Tamura S, Takeshima K, Hirasaka K, Nakao R, Kishi K, Nikawa T: Overexpression of osteoactivin protects skeletal muscle from severe degeneration caused by long-term denervation in mice. *J Med Invest*, 54(3-4):248-254, 2007, 査読有
- ⑩ Takahashi H, Nakao R, Hirasaka K, Kishi K, Nikawa T: Effects of single administration of Rokumi-gan (TJ-87) on serum amino acid concentration of 6 healthy Japanese male volunteers. *J Med Invest*, 54(1-2):91-8, 2007, 査読有
- ⑪ Oarada M, Gonoi T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N: Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71(1):174-82, 2007, 査読有
- ⑫ Nakano S, Mishiro T, Takahara S, Yokoi H, Hamada D, Yukata K, Takata Y, Goto T, Egawa H, Yasuoka S, Furouchi H, Hirasaka K, Nikawa T, Yasui N: Distinct expression of mast cell tryptase and protease activated receptor-2 in synovia of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Rheumatol*, 26(8):1284-92, 2007, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 平坂勝也, Dalia Hemdan, 加川祥子、河野尚平、中尾玲子、原田晃子、奥村裕司、二川健: 微小重力環境下での筋萎縮に対するポリフェノールの阻害効果、第22回日本宇宙生物科学会、奈良、2008年10月26日
- ② Kagawa S, Hirasaka K, Kohno S, Okumura Y, Nikawa T: Ubiquitin ligase, MuRF-1 regulates myosin heavy chain type IIa transcripts during muscle atrophy under microgravity conditions, 37th COSPAR Scientific Assembly, Canada, Montreal, 2008年7月18日
- ③ 平坂勝也、加川祥子、河野尚平、中尾玲子、助野晃子、奥村裕司、二川健: 飽和脂肪酸によるCbl-bを介したマクロファージの活性化のメカニズム、第62

回日本栄養・食糧学会、埼玉、2008年5月3日

- ④ 加川祥子、平坂勝也、河野尚平、藤倉由浮都、中尾玲子、二川健: Cbl-bを介したマクロファージ活性化制御機構、日本栄養・食糧学会中四国支部会、広島、2007年11月17日
- ⑤ Shohei Kohno, Katsuya Hirasaka, Momoko Ogawa, Sachiko Kagawa, Jumpei Goto, Harumi Furochi, Kazumi Ishidoh, Takeshi Nikawa: Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice, General Meeting of the International Proteolysis Society, Patras, Greece, 2007年10月27日
- ⑥ 平坂勝也、河野尚平、阿部愛波、上西千晶、岸恭一、二川健: Cbl-b欠損によるマクロファージの活性化とインスリン抵抗性、第61回日本栄養・食糧学会、京都、2007年5月19日

[その他]

ホームページ等

学会賞受賞をホームページで公開

<http://www.hosp.med.tokushima-u.ac.jp/university/servlet/index?&level=4&reference=0/10002/5/30010/20032>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平坂 勝也(HIRASAKA KATSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスケア・イノベーション研究部・助教

研究者番号: 70432747