

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06545

研究課題名(和文) グアニリンとその受容体を発現するマクロファージによる脂肪蓄積抑制機構の解明

研究課題名(英文) Inhibition of lipid accumulation in adipocytes by guanylin and its receptor expressed macrophages

研究代表者

秋枝 さやか (Akieda, Sayaka)

宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・准教授

研究者番号：20549076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、高脂肪食耐性ラットの腸間膜脂肪組織内マクロファージにおいて生理活性物質グアニリン(Gn) およびその受容体であるGC-Cが高発現していることを見出した。本研究ではマクロファージのGn/GC-Cは飽和脂肪酸特異的に転写が促進し、GnではTLR4/NF- κ Bを介するが、GC-CはMAPKなどの別の経路を介する可能性が示唆された。また、GnおよびGC-Cが高発現したマクロファージはIL-15などのサイトカインを産生し、脂肪細胞の脂肪酸合成酵素の発現を低下させることを明らかにした。これらの結果からGn/GC-Cシステムは高脂肪食による慢性炎症や肥満を抑制している可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、高脂肪食を摂取しても肥満にならないラットに着目し、同ラットは腸間膜脂肪組織内マクロファージにおいて生理活性物質グアニリン(Gn) およびその受容体であるGC-Cが高発現していることを見出した。これまでGn/GC-Cは水や電解質の調節に機能することがよく知られているが、肥満との関連については明らかになっていなかった。本研究の成果は、マクロファージのGn/GC-Cシステムが肥満制御に機能的意義を持つ生体制御システムであること解明するものであり、Gn/GC-C発現マクロファージは脂肪酸に特異的なシステムを持ち、脂肪組織との相互作用を通じて全身のエネルギー調節に関わっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, we showed that double-transgenic rats overexpressing guanylin (Gn), a bioactive peptide, and its receptor, guanylyl cyclase-C (GC-C), specifically in macrophages demonstrate an antiobesity phenotype and low-expression levels of proinflammatory cytokines in the mesenteric fat even when fed a high-fat diet. Here, we showed that palmitic acid induced Gn gene expression via Toll-like receptor 4 (TLR4) and NF- κ B. Moreover, we demonstrated that NF- κ B binding to the Gn promoter was responsible for the induction of gene transcription by palmitic acid or lipopolysaccharide. Our results indicate that saturated fatty acids such as palmitic acid activate Gn gene expression via the NF- κ B pathway. In addition, our study support the hypothesis that IL-15 secreted from Gn/GC-C-expressing macrophages contributes to the inhibition of fatty acid synthase and lipid accumulation in adipocytes, leading to obesity resistance.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：肥満 生理活性物質 マクロファージ エネルギー代謝調節

1. 研究開始当初の背景

エネルギー恒常性の維持には、エネルギー摂取と消費のバランスが重要であり、肥満はエネルギー恒常性が破綻している状態である。肥満の主な原因の一つとして、高カロリー食の摂取が挙げられるが、高カロリー食に対する生体の反応は個体によるバリエーションが大きく、遺伝子背景が均一であるマウスにおいても、高脂肪食で変動する遺伝子変化は個体間で大きく異なることから、原因因子を特定することは容易ではない。申請者の研究グループは、自然に存在するラットの中に、高脂肪食を食べても肥満にならない肥満抵抗性ラットを見出し、同ラットを解析したところ、内臓脂肪のマクロファージにおいて、生理活性ペプチドであるグアニリン(Gn)とその受容体である GC-C の両分子が高発現している個体がいることを明らかにした(Akieda, et al. ORCP 2013; Akieda, et al. J Lipid Res 2013)。本研究では Gn/GC-C システムを介した脂肪蓄積抑制機構を解明することで、生体が肥満を回避するメカニズムとは何かを明らかにし、生活習慣病の基盤となる肥満の予防や治療に応用することを目指す。

2. 研究の目的

従来の研究では、肥満の成因解明に重点が置かれてきたが、申請者は「肥満を回避するメカニズムを明らかにする」という新たな視点から肥満制御機構の解明に臨み、肥満予防や治療に新たな分野を切り開くものと考えられる。申請者は、内臓脂肪のマクロファージに Gn/GC-C が高発現しているラットは、高脂肪食に対して肥満抵抗性を示すという知見を得ていることから、本研究ではマクロファージにおける Gn/GC-C システムの機能を解明し、肥満の基盤となる慢性炎症を抑制する機序を明らかにする。さらに Gn/GC-C 発現マクロファージから産生・分泌され、脂肪の蓄積を抑制する機能を持つ液性因子を探索する。これまでに、Gn および GC-C は、主に消化管で発現し、水・電解質代謝調節に機能していることが知られているが、マクロファージでの発現や肥満制御分子としての役割は、申請者の研究グループ以外に報告されておらず、高脂肪食への曝露から生体を防御する新たな機能分子として着目される。また、この液性因子の同定は、肥満治療の新たなシーズ発掘への基盤研究となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) マクロファージにおけるGnおよびGC-Cの発現調節機構の解明

Gn/GC-Cシステムは脂肪酸に対して特異的な機能を持つことが考えられることから、本研究では、Gn/GC-C発現マクロファージ細胞株に、飽和脂肪酸(ラウリン酸, ミリスチン酸, パルミチン酸)や不飽和脂肪酸(オレイン酸, リノール酸, リノレン酸)をそれぞれ添加し、脂肪酸によるGnおよびGC-Cの発現量の違いを検討する。脂肪酸は、マクロファージのToll-like receptorを介してNF- κ BやMAPKのカスケードを亢進させ、炎症性サイトカインなどの発現を制御している。そこで本研究では、NF- κ B経路の阻害剤やMAPK経路の阻害剤を使用し、脂肪酸添加後のGnやGC-Cの発現調節とNF- κ BやMAPKカスケードとの関連を検討する。NF- κ BやMAPKにより発現制御を受ける転写因子を検索し、GnやGC-Cのプロモーター領域と結合する候補因子を抽出する。抽出されたいずれかの候補因子がGnやGC-Cの発現調節に機能することをルシフェラーゼアッセイ系を用いて確認する。

さらに、Gn/GC-CシステムのセカンドメッセンジャーであるcGMP量を脂肪酸刺激前後のマク

ロファージで測定する。また、Gn/GC-C発現マクロファージにおけるcGMP依存性のプロテインキナーゼ(PKG)やPKGのターゲットタンパクで抗肥満に機能する vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)の発現量についても解析する。

(2) Gn/GC-C 発現マクロファージ由来の新規ペプチド性因子の同定

Gn/GC-C 発現マクロファージの培養液で脂肪細胞を培養すると、脂肪蓄積の抑制と脂肪酸合成酵素 ; Fas の発現が有意に低下する。そこで、Fas を指標としたアッセイ系を用いて、脂肪抑制に機能するマクロファージ由来の新規ペプチド性因子を同定する。

4 . 研究成果

(1) マクロファージにおけるGnおよびGC-Cの発現調節機構の解明

Gn/GC-C 発現マクロファージの Gn および GC-C の mRNA 発現量は飽和脂肪酸(ラウリン酸, ミリスチン酸, パルミチン酸)刺激により顕著に増加し、セカンドメッセンジャーである cGMP も増加した。一方で、不飽和脂肪酸(オレイン酸, リノール酸, リノレン酸)刺激に対しては Gn および GC-C の発現量に変化は認められなかった。脂肪酸は、マクロファージの Toll-like receptor を介して NF- κ B や MAPK のカスケードを亢進させ、炎症性サイトカインなどの発現を制御していることが知られていることから、これらの経路を検討したところ、Gn mRNA の発現量は TLR4 や NF κ B を介して増加することを明らかにした。さらに、Gn プロモーターへの NF- κ B の結合が、パルミチン酸または LPS による遺伝子転写の誘導に関与していることを示した。これらの結果から、パルミチン酸などの飽和脂肪酸が NF- κ B 経路を介して Gn 遺伝子の発現を活性化し、活性化された Gn-GC-C システムがマクロファージの高脂肪食誘発性炎症性サイトカインの阻害に寄与する可能性があることが示唆された。

(2) Gn/GC-C 発現マクロファージ由来の新規ペプチド性因子の同定

脂肪抑制に機能するマクロファージ由来の新規ペプチド性因子を探索し、同定されたいくつかのペプチドの中で、Gn/GC-C 発現に由来するインターロイキン-15 (IL-15) が脂肪細胞の脂質蓄積を調節するかどうかを検討した。IL-15 は、培養脂肪細胞において STAT5 を介して脂肪酸合成酵素と脂質の蓄積を阻害した。高脂肪食を負荷した dTg ラットの腸間膜脂肪における IL-15 mRNA およびタンパク質レベルは、高脂肪食を負荷した WT ラットのものよりも有意に高かった。高脂肪食を負荷した dTg ラットの腸間膜脂肪におけるリン酸化された STAT5 レベルは、高脂肪食を負荷した WT ラットのものと比較して増加した。さらに、腸間膜脂肪中の脂肪酸合成酵素の mRNA レベルは、高脂肪食を負荷 WT ラットよりも高脂肪食を負荷した dTg ラットの方が低かった。これらの結果は、Gn-GC-C を発現するマクロファージから分泌される IL-15 が、脂肪細胞における脂肪酸合成酵素と脂質の蓄積の阻害に寄与し、肥満抵抗性につながるという仮説を支持している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horii Y, Nakajima S, Akieda-Asai S, Ohta R, Kawaguchi M	4. 巻 229
2. 論文標題 Maternal traits during lactation period reduce the anxiety-related behavior in male offspring: Results from a fostering study in hatano rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Behav	6. 最初と最後の頁 113209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.physbeh.2020.113209	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 Akieda-Asai S, Hao M, Date Y	4. 巻 317
2. 論文標題 Palmitic acid induces guanylin gene expression through the toll-like receptor 4/nuclear factor kB pathway in rat macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Metab	6. 最初と最後の頁 C1239-C1246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00081.2019.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋枝さやか, 伊達紫
2. 発表標題 軟食摂取による腸内細菌叢の変化
3. 学会等名 第11回ペプチド・ホルモン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋枝さやか, 伊達紫
2. 発表標題 グアニリン・グアニル酸シクラーゼC発現マクロファージ由来のIL-15による脂肪蓄積抑制機構
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	伊達 紫 (Date Yukari)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------