

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591126
 研究課題名(和文) 脂肪組織M1、M2マクロファージによるインスリン抵抗性の制御についての研究
 研究課題名(英文) Regulation of insulin resistance by adipose tissue M1/M2 macrophages.

研究代表者
 戸辺 一之 (TOBE KAZUYUKI)
 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授
 研究者番号：30251242

研究成果の概要(和文)：

肥満脂肪組織には炎症性のM1マクロファージが著明に増加し、抗炎症性のM2マクロファージの比率が低下することでインスリン感受性が低下する(Diabetes 58: 2574-2582, 2009)。さらにPPAR γ 活性化作用を有するアンギオテンシンII受容体拮抗薬、テルミサルタンがマウス脂肪組織のM1/M2マクロファージの極性を変えることによりインスリン感受性を改善することを報告した(Endocrinology 152: 1789-1799, 2011)。また肥満脂肪組織の低酸素状態がM1マクロファージの誘導に重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：

In obese adipose tissues, the number of inflammatory M1 macrophage is dramatically increased and the ratio of antiinflammatory M2 macrophage is reduced, resulting the decrease of insulin sensitivity and development of obesity complications(Diabetes 58: 2574-2582, 2009). I found that telmisartan, an angiotensin II type I receptor blocker, improved insulin resistance with its PPAR γ activity, by modulating M1/M2 macrophage ratio (Endocrinology, 152: 1789-1799, 2011). I also found that obesity-induced hypoxia in adipose tissue is involved in M1 polarization of macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：肥満・脂肪組織・炎症・インスリン抵抗性・マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

肥満とそれに伴って生じるインスリン抵抗性はいわゆるメタボリックシンドロームを惹起し、我が国の死因の第一位を占める心血管疾患の主因となっている。したがって肥満

とインスリン抵抗性の解明と治療法の確立が極めて重要である。肥満時には、脂肪組織においてTNF α やIL-6などの炎症性サイトカインやMCP-1などのケモカインが増加していることは広く知られる。我々は、MCP-1を脂

脂肪組織特異的に過剰発現したマウスを作製し、これが脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の発症に関与していることを明らかにした (Kamei, N. **Tobe, K.** Kadowaki, T et al: J. Biol. Chem., 281:26602, 2006)。また、肥満の初期には脂肪組織に小型の脂肪細胞が増加し、その周辺に CD68 陽性細胞が出現することを見出した (Nishimura, S. **Tobe, K.** Kadowaki, T et al: Diabetes, 56:1517, 2007)。今日では、インスリン抵抗性発症には、この脂肪組織に浸潤したマクロファージが主役を担っていると考えられている。

脂肪組織に浸潤するマクロファージは少なくとも 2 種類存在すると考えられている。インスリン抵抗性と関連がよく知られるマクロファージは、IFN γ などの Th1 刺激によって単球から分化誘導されるものであり、M1 マクロファージ (M1 ϕ) と呼ばれる。これらは TNF α などの炎症性サイトカインを強く発現し、CD11c が陽性であることを特徴とする。一方、肥満の有無にかかわらず脂肪組織内には恒常的にマクロファージが存在する。これらは M2 マクロファージ (M2 ϕ) とよばれ、IL-4 や IL-13 などの Th2 刺激によって分化誘導される。CD11c 陰性で、抗炎症性サイトカインである IL-10 を強く発現するなど、M1 ϕ とは異なる遺伝子発現の特徴を持つ。M2 ϕ は組織リモデリングに関与しているなどの機能が知られているが、インスリン感受性制御におけるその役割について詳細は不明である。最近興味深いことに、PPAR γ シグナルの活性化が M2 ϕ への分化誘導に重要であると報告された (Bouhlef, et. al: Cell Metab., 6: 137, 2007, Odegaard, et. al: Nature, 447: 1116, 2007)。PPAR γ はインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体の受容体であることから、同薬剤によるインスリン抵抗性改善における M2 ϕ の関与が示唆されている。また最近、脂肪細胞から分泌される IL-4/IL-13 が STAT6 の活性化を介して細胞内代謝を調節し M2 ϕ が誘導されると報告された。

我々は、M1 ϕ のマーカーとして CD11c を、M2 ϕ のマーカーとして CD206 を用い、フローサイトメトリーにより精巣上体脂肪中のマクロファージを分画し解析している。C57BL/6J マウスを高脂肪食処置すると、耐糖能は悪化し精巣上体脂肪の M1、M2 ϕ の数はともに著明に増加する。また脂肪組織における M1 ϕ のマーカー遺伝子 (TNF α MCP-1 など) 発現量および M2 ϕ のマーカー遺伝子である IL-10 の発現量は増加していた。このマウスにチアゾリジン薬を投与すると耐糖能は改善し、このとき精巣上体脂肪では M1、M2 ϕ の数が減少した。興味深いことに、これらマクロファージの比率は M1 優位から M2 優位へと変化していた。また M1 ϕ のマーカー遺伝子の発現量は優位に低下し、この M1 ϕ の数および

それが産生する炎症性サイトカイン、ケモカインの減少がインスリン抵抗性改善のメカニズムの一部を担っていると考えられた。また IL-10 の発現量はチアゾリジン誘導体投与によりさらに増加していた。IL-10 は抗炎症性サイトカインの一つであり、インスリン抵抗性改善への関与が示唆されている。我々は、M2 ϕ から産生される IL-10 の増加はインスリン抵抗性改善やさらなる M2 ϕ の分化誘導に関与していると考えている。実際、アデノウイルスベクターを用いて高脂肪食負荷マウスに IL-10 を全身過剰発現させると耐糖能は改善し、脂肪組織の M2 ϕ のマーカー遺伝子が著明に増加していた。IL-10 による M2 ϕ 誘導の分子メカニズムについては今後も検討を進めていく予定である。

一方で、以前我々は、降圧剤の中でもとくに、PPAR γ 活性化作用を有することで知られるアンギオテンシン II 受容体拮抗薬、テルミサルタンが、ヒトにおいてインスリン抵抗性を改善する作用があることを報告してきた (*Diabetes Res Clin Pract.* 77; 210-4, 2007)。そこでこのテルミサルタンが、肥満マウスの内臓脂肪組織において、M1/M2 ϕ の数や比率に影響を与えるのではないかと仮説を立てるに至った。

また近年、肥満内臓脂肪組織は低酸素環境にあることが報告され、この低酸素環境が脂肪細胞の機能異常を引き起こしアディポネクチンなどのアディポカインの異常からインスリン抵抗性増悪因子となると考えられている (*Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293; E1118-E1128, 2007, *Diabetes* 56; 901-911, 2007)。また一般にマクロファージは腫瘍や動脈硬化性病変において低酸素領域に集簇し、低酸素刺激によりより炎症性の性格を獲得することなどが報告されている (*Blood* 104; 2224-2234, 2004, *J Immunol.* 177; 1941-1955, 2006)。このことから我々は脂肪組織においても肥満による低酸素環境が M1 ϕ の誘導に関与するのではないかと考えるようになった。

一方、これまで M1 ϕ がインスリン抵抗性に関与することはよく知られているものの、M2 ϕ の役割についてはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

肥満に伴うインスリン発症における、脂肪組織 M1/M2 ϕ の役割を明らかにすること、及び M1/M2 ϕ の誘導機構を明らかにすることである。すなわち、

(1) 様々なインスリン感受性状態での脂肪組織 M1/M2 ϕ の極性を明確にすること。

(2) PPAR γ 活性化作用を持ち、インスリン感受性改善効果があるとされるアンギオテン

シンII受容体拮抗薬、テルミサルタンが、脂肪組織 M1/M2 φ に与える影響を明らかにすること。

(3) 肥満に伴う脂肪組織の低酸素環境が脂肪組織 M1/M2 φ に与える影響を明らかにすること。

(4) 非肥満脂肪組織にも常在する M2 φ の役割を明らかにすること。
である。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウスに普通食、または 60(kcal)高脂肪食、または高脂肪食+インスリン抵抗性改善薬である pioglitazone を 10mg/kg/day となるように投与した状態で 12 週間飼育し、脂肪組織の M1/M2 φ の数や比率、極性をフローサイトメトリー、免疫組織染色、RT-PCR 法で解析した。アデノウイルスを用いて IL-10 を C57BL/6J マウスに過剰発現し脂肪組織の M1/M2 マーカーについて RT-PCR 法で解析した。

(2) 30%(kcal)高脂肪食投与を 24 週間行い肥満したマウスにテルミサルタンまたはカンデサルタンを 3mg/kg/day となるように飲水に混じ、5 週間投与した。血圧、体重、インスリン負荷試験、糖負荷試験にて耐糖能の評価を行ったのち、精巣上体脂肪組織を摘出し、重量、脂肪細胞の面積測定を行い、その遺伝子発現レベルをマイクロアレイ法及び RT-PCR 法で測定した。また精巣上体脂肪組織の M1/M2 φ を免疫組織染色及び、フローサイトメトリーで解析した。

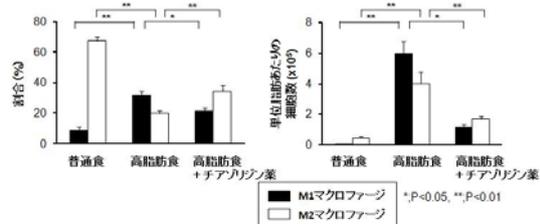
(3) 普通食または高脂肪食投与したマウスの脂肪組織を採取し遺伝子発現レベルを RT-PCR 法で解析した。M1/M2 φ について、フローサイトメトリーで比較した。また低酸素マーカーであるピモニダゾールを 60mg/kg 腹腔内投与し、30 分後に脂肪組織を採取し、免疫組織染色、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーで解析した。マウス骨髄由来マクロファージまたは精巣上体脂肪の間質細胞 (stromal vascular fraction) を 1%O₂ の低酸素培養器で培養し、遺伝子発現レベルを RT-PCR 法で検討した。

(4) M2 φ のマーカーである、CD206 のプロ

モーター領域にジフテリアトキシンの受容体遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (CD206-DTR Tg マウス) を作成した。このマウスではジフテリアトキシンを腹腔内投与することにより、CD206 発現細胞に選択的にアポトーシスを誘導することができる。CD206 陽性 M2 φ 選択的除去後のマウスの耐糖能をインスリン負荷試験、糖負荷試験にて評価した。

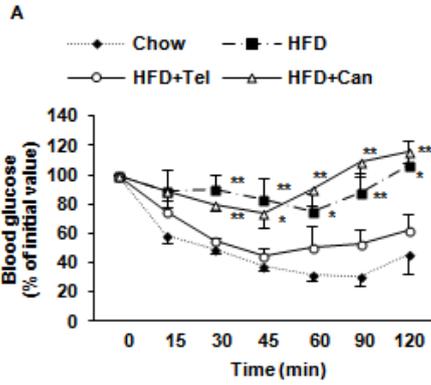
4. 研究成果

(1) 高脂肪食処置群では、耐糖能は悪化し精巣上体脂肪の M1 φ の数は著明に増加した。また脂肪組織における M1 φ のマーカー遺伝子 (TNFα MCP-1 など) 発現量および M2 φ のマーカー遺伝子である IL-10 の発現量は増加した。pioglitazone 投与群では耐糖能は改善し、このとき精巣上体脂肪では M1、M2 φ の数が減少した。興味深いことに、これらマクロファージの比率は M1 優位から M2 優位へと変化していた。

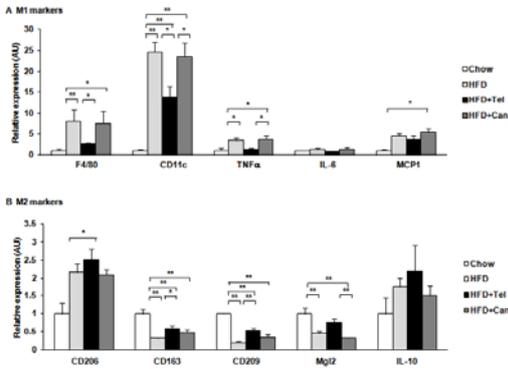


また M1 φ のマーカー遺伝子の発現量は優位に低下し、この M1 φ の数およびそれが産生する炎症性サイトカイン、ケモカインの減少がインスリン抵抗性改善のメカニズムの一部を担っていると考えられた。また IL-10 の発現量はチアゾリジン誘導体投与によりさらに増加していた。アデノウイルスベクターを用いて高脂肪食負荷マウスに IL-10 を全身過剰発現させると脂肪組織の M2 マクロファージのマーカー遺伝子が著明に増加した (Diabetes 58: 2574-2582, 2009)。

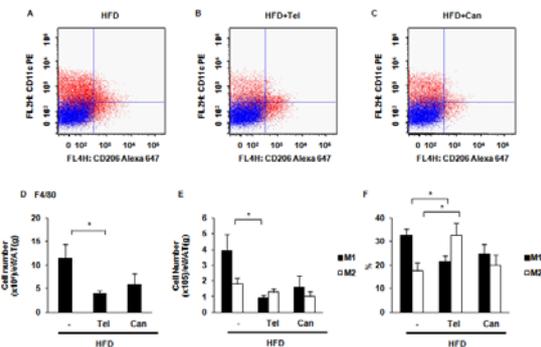
(2) テルミサルタンは血圧を低下させ、摂餌量を変えずに高脂肪食投与期間中の体重増加を抑制した。内臓脂肪である後腹膜脂肪の量を減少させ、脂肪細胞のサイズを縮小した。またインスリン負荷試験において、高脂肪食投与によるインスリン抵抗性を有意に改善した。



マイクロアレイ法及び RT-PCR 法で測定した脂肪組織の遺伝子発現レベルでは、CD11c、TNF α など M1 ϕ のマーカー遺伝子を減少させ、CD163、CD209 など M2 ϕ のマーカー遺伝子を増加させた。



免疫組織染色及びフローサイトメトリーによる検討では、テルミサルタンが高脂肪食投与肥満マウスにおける内臓脂肪 M1 ϕ の数と比率を低下させ、逆に M2 ϕ の比率を上昇させることがわかった。



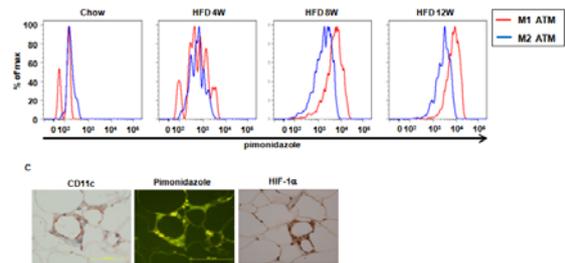
このとき PPAR γ の標的遺伝子である Adiponectin や PEPCK などの遺伝子発現は増加していた。

これらの結果から、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるテルミサルタンは、降圧作用のみならず、PPAR γ 活性化作用を介して肥満マウスの内臓脂肪組織における炎症性 M1 ϕ を減少させ、抗炎症性 M2 ϕ の比率を増加させることで、内臓脂肪組織の炎症を軽減し、インスリン感受性を改善させる作用があるこ

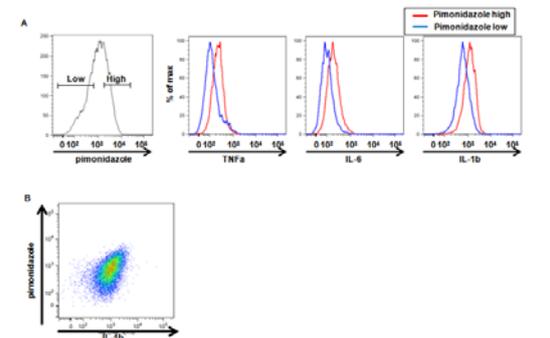
とが示された (Endocrinology 152: 1789-1799, 2011)。

(3) フローサイトメトリーで回収した高脂肪食負荷マウス脂肪組織の M1/M2 ϕ で遺伝子発現の相違を探索すると、M1 ϕ では HIF1 α 、PDK-1、VEGF など嫌氣的代謝関連の遺伝子発現レベルが高かった。肥満脂肪組織では、脂肪細胞に比べ stromal vascular fraction での HIF-1 α の発現レベルの上昇が著しく、VEGF、MIF、Hmox1 など複数の HIF-1 α 下流遺伝子の発現が増加していた。また低酸素マーカーであるピモニダゾールを用いてウェスタンブロット法及びフローサイトメトリーで低酸素レベルを評価すると、肥満脂肪組織は非肥満脂肪組織よりピモニダゾールの取り込みが強い上、ピモニダゾール取り込みの強い M1 ϕ の数が著増していた。

次に、フローサイトメトリー及び免疫組織染色により M1 ϕ と M2 ϕ の低酸素レベルを比較すると、肥満状態では M1 ϕ が M2 ϕ よりピモニダゾールの取り込みが強く、低酸素状態にあることがわかった。



さらに、ピモニダゾールの取り込みが強い脂肪組織マクロファージは、弱いマクロファージより TNF α や IL-6 など炎症性サイトカインのレベルが高いことをフローサイトメトリーで確認した。



これらの結果から肥満状態では、内臓脂肪組織が低酸素にさらされており、そこに爆発的に増加する M1 ϕ は M2 ϕ より著明に低酸素状態になっていること、さらに低酸素環境下の脂肪組織マクロファージはより炎症性であることが示唆された。次に低酸素環境が、M1/M2 ϕ への分化に与える影響を明らかにするため、マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) および stromal vascular fraction を

低酸素下(1%O₂)で培養したところ、CD11c や IL-1β、IL-6 など M1 マーカーが増加した。低酸素環境そのものが M1 的性格を持つマクロファージの誘導を促進することが示唆された。

これらの結果から、肥満による内臓脂肪組織の低酸素環境が炎症性の M1 φ の分化誘導に関与し、これがインスリン抵抗性増悪の一因となると考えられた。現在論文投稿準備中である。

(4) CD206-DTR Tg マウスを作成し解析を開始した。予想に反して普通食投与および高脂肪食投与下において、CD206-DTR Tg マウスでは CD206 陽性細胞を除去するとインスリン負荷試験、糖負荷試験において糖代謝が改善する結果が認められた。そのメカニズムについて、現在検討中である。

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 8 件)

①Watanabe Y., Nakamura T., Ishikawa S., Fujisaka S., Usui I., Tsuneyama K., Ichihara Y., Wada T., Hirata Y., Suganami T., Izaki H., Akira S., Miyake K., Kanayama H., Shimabukuro M., Sata M., Sasaoka T., Ogawa Y., Tobe K., Takatsu K., and Nagai Y. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes*. 2012 Mar 6. [Epub ahead of print] 査読有

②Fujisaka S., Usui I., Kanatani Y., Icutani M., Takasaki I., Tsuneyama K., Tabuchi Y., Bukhari A., Yamazaki Y., Suzuki H., Senda S., Aminuddin A., Nagai Y., Takatsu K., Kobayashi M., Tobe K. Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology* 2011;152(5):1789-99. 査読有

③Suzuki H., Usui I., Kato I., Oya T., Kanatani Y., Yamazaki Y., Fujisaka S., Senda S., Ishii Y., Urakaze M., Mahmood A., Takasawa S., Okamoto H., Kobayashi M., Tobe K., Sasahara M. Deletion of platelet-derived growth factor receptor-β improves diabetic nephropathy in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α (Thr286 Asp) transgenic mice. *Diabetologia* 2011;54:2953-2962. 査読有

④Fujisaka S., Usui I., Bukhari A., Icutani

M, Oya T., Kanatani Y., Tsuneyama K., Nagai Y., Takatsu K., Urakaze M., Kobayashi M., Tobe K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009; 58: 2574-2582. 査読有

⑤Kobashi C, Asamizu S, Ishiki M, Iwata M, Usui I, Yamazaki K, Tobe K., Kobayashi M, Urakaze M. Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway. *J Inflamm(Lond)*. 2009; 27: 6-25. 査読有

⑥Yamazaki Y, Usui I, Kanatani Y, Matsuya Y, Tsuneyama K, Fujisaka S., Bukhari A, Suzuki H, Senda S, Imanishi S, Hirata K, Ishiki M, Hayashi R, Urakaze M, Nemoto H, Kobayashi M, Tobe K. Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 297: E1179-E1186. 査読有

⑦Asamizu S, Urakaze M, Kobashi C, Ishiki M, Norel Din AK, Fujisaka S., Kanatani Y, Bukhari A, Senda S, Suzuki H, Yamazaki Y, Iwata M, Usui I, Yamazaki K, Ogawa H, Kobayashi M, Tobe K. Angiotensin II enhances the increase in monocyte chemoattractant protein-1 production induced by tumor necrosis factor-α from 3T3-L1 preadipocytes. *J Endocrinol*. 2009; 202: 199-205. 査読有

⑧Suzuki H, Kato I, Usui I, Takasaki I, Tabuchi Y, Oya T, Tsuneyama K, Kawaguchi H, Hiraga K, Takasawa S, Okamoto H, Tobe K., Sasahara M. Characterization of diabetic nephropathy in CaM kinase IIα (Thr286Asp) transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 379: 38-42. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

①薄井勲、肥満・メタボリックシンドロームと慢性炎症 肥満脂肪組織の低酸素がマクロファージの極性に与える影響、第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 24 日、兵庫

②Shiho Fujisaka, Obesity-induced hypoxia regulates the polarization of adipose tissue macrophages. American Diabetes Association's 71st Scientific Sessions, 2011 年 6 月 26 日, San Diego, CA

③藤坂志帆、低酸素環境に対する M1/M2 マクロファージの反応性に関する検討、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 21 日、札幌

④薄井勲、インスリン抵抗性のメカニズムと新しい治療戦略 脂肪組織マクロファージとインスリン抵抗性、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 20 日、札幌

⑤仙田聡子、摂食制限と b3 アドレナリン受容体作動薬はインスリン受容体基質(IRS)-2 欠損マウスのレプチン抵抗性を改善させる、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 19 日、札幌

⑥藤坂志帆、低酸素環境に対する M1/M2 マクロファージの反応性に関する検討、Advans 研究会 2010、2010 年 12 月 22 日、千葉

⑦藤坂志帆、脂肪組織 M1/M2 マクロファージとインスリン抵抗性の関連について

⑧Shiho Fujisaka, Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. 14th International Congress of Endocrinology, 2010 年 3 月 26 日、京都

⑨藤坂志帆、脂肪組織 M1/M2 マクロファージとインスリン感受性の関連についての検討、第 30 回日本肥満学会、2009 年 10 月 9 日、浜松

⑩薄井勲、視床下部インターロイキン 10 シグナルがインスリン感受性に与える影響、第 30 回日本肥満学会、2009 年 10 月 9 日、浜松

⑪薄井勲、脂肪組織の炎症と産科ストレスに関する検討、The 6th Annual Scientific Meeting of Insulin Resistance and Metabolic Syndrome Study Group、2009 年 8 月 1 日、東京

⑫Shiho Fujisaka, Regulatory Mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. American Diabetes Association 69th Scientific Sessions, 2009 年 6 月 5 日、New Orleans

⑬薄井勲、インターロイキン 10 とインスリン感受性調節、第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会、2009 年 5 月 21 日、大阪

⑭薄井勲、脂肪組織マクロファージの制御とインスリン感受性、第 82 回日本内分泌学会学術集会、2009 年 4 月 23 日、前橋

⑮藤坂志帆、脂肪組織 M1/M2 マクロファージとインスリン感受性の関連に関する検討、第 82 回日本内分泌学会学術集会、2009 年 4 月 23 日、前橋

〔図書〕(計 12 件)

①薄井勲、協和企画、Diabetes Journal、2011 年、6 ページ

②薄井勲、日本臨床社、日本臨床、2011 年、7 ページ

③薄井勲、日本臨床社、日本臨床、2011 年、8 ページ

④薄井勲、医学の世界社、ホルモンと臨床、2011 年、5 ページ

⑤藤坂志帆、メディカルレビュー社、The Lipid、2011 年、5 ページ

⑥薄井勲、診断と治療社、糖尿病学、2010 年、14-21

⑦薄井勲、診断と治療社、糖尿病学の進歩 2010 第 44 集、2010 年、184-188

⑧薄井勲、メディカルレビュー社、糖尿病ナビゲーター(第 2 版)、2010 年、224-225

⑨藤坂志帆、北隆館、Bio Clinica、2010 年 30-34

⑩藤坂志帆、医学書院、Medicina、2010 年 1892-1897

⑪薄井勲、医歯薬出版、医学のあゆみ、2009 年、3 ページ

⑫藤坂志帆、ライフメディコム、カレントセラピー、2009 年、5 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸辺 一之 (TOBE KAZUYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：30251242

(2) 研究分担者

藤坂 志帆 (FUJISAKA SHIHO)

富山大学・大学病院・医員

研究者番号：30512082

小清水 由紀子 (KOSHIMIZU YUKIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：30511828

篠田 晃一郎 (SHINODA KOUICHIROU)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：40377312

(3) 連携研究 ()

研究者番号：