

## 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 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591288

研究課題名（和文）生体内低アディポネクチン量における易炎症反応性の解析

研究課題名（英文）The effect of low level of adiponectin on inflammation in vivo

## 研究代表者

根来 孝治 (NEGORO TAKAHARU)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：70218270

研究成果の概要(和文):生体内アディポネクチン低値を示すことによる易炎症性モデルとして、炎症環境下を模倣した酸応答性モデルとコラーゲン抗体により惹起した関節リウマチモデルを解析した。予測したとおり、低アディポネクチン環境下では、マクロファージの細胞膜上にある酸感受性チャネルである acid-sensing ion channels (ASICs)の閾値が低下しており、酸に対する応答性が亢進していた。それにより、酸刺激によるマクロファージの炎症性サイトカイン産生が亢進していた。また、関節リウマチモデルでも同様な結果が得られ、現在解析中である。

研究成果の概要（英文）：We analyzed two models for higher susceptibility to inflammatory stimuli under low level of adiponectin. One was an acid induced writhing model and the other was a rheumatoid arthritis (RA) model caused by the antibody of type 1 collagen. It's to be anticipated that the threshold of acid-sensing ion channels (ASICs) to acid stimuli was reduced and the expression of inflammatory cytokines was enhanced in macrophages under the condition. Moreover, the similar results go on being observed in RA model.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：炎症学

## 1. 研究開始当初の背景

アディポネクチンは、インスリン抵抗性の改善、抗動脈硬化作用、抗炎症作用に関わり、生体の恒常性維持に重要なアディポカインである。主生産組織は脂肪細胞であるが、生体内局所で炎症が生じるとその局所で産生が増加する(異所発現)。しかし、肥満などの特殊な環境下では微弱な炎症が慢性化し、脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌が低

下するため末梢循環血流量中濃度は低下する。非肥満者の正常脂肪組織には、M2型のマクロファージが主に常在しており、IL-10等の抗炎症性サイトカインを分泌し、免疫のバランスを正常に維持している。しかし、肥満者の脂肪組織には、炎症性細胞、特にM1型のマクロファージが増えており、TNF- $\alpha$ 、IL-6等の炎症性サイトカインの産生が増加するため、脂肪細胞によるアディポネクチン

の転写が抑制され免疫のバランスが崩れ、炎症が慢性化へとシフトする。当研究室は、アディポネクチンの活性をタンパク質レベルで様々な側面より生化学的に解析してきた。現在、C57BL/6 バックボーンのアディポネクチン anti-sense transgenic (AsTg) mouse (全身で低アディポネクチン値を示す) と adiponectin sense transgenic (STg) mouse (全身で高アディポネクチン値を示す) を保有している。特に、全身でアディポネクチン発現量が低いマウス(AsTg)は、易炎症性であると考えられるため、その易炎症性を証明しメカニズムを解析することによりヒトの疾患における慢性炎症性病態を解明する一端を担えると推測した。

## 2. 研究の目的

上述したように血中アディポネクチン濃度の低い adiponectin anti-sense Tg mouse の易炎症性を証明し、そのメカニズムを解析することを目的とした。更に、炎症病態モデルを作製し全身でアディポネクチン低発現環境下における炎症病態を解析した。具体的には、マクロファージ、T細胞、B細胞、顆粒球等の免疫担当細胞の性質がどのように変化しているか解析する。このマウスでは、アディポネクチンの抗炎症作用として既に報告があるマクロファージの機能制御だけではなく他の免疫担当細胞の機能が定常状態で亢進し、環境要因などの刺激(食物、ストレス等)により微弱な炎症が全身に生じている可能性があることを推測している。詳細な各免疫担当細胞の機能を解析した上で、局所における免疫細胞の関わりが比較的良く解析されているリウマチモデル、喘息モデル作製を検討している。AsTg マウスは、易炎症性であるため様々な病態モデルが作製しやすいと考えている。これらモデルの解析により *in vivo* でのアディポネクチンの抗炎症作用メカニズムがより明確に出来ると考えた。

## 3. 研究の方法

(1) AsTg マウスの易炎症性を解析するために炎症病態モデルを作製し検討した。

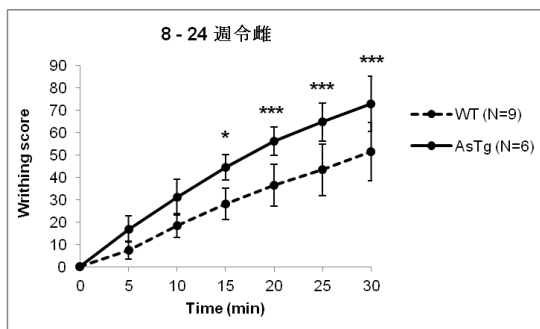


図1. Writhing response to acetic acid in female AsTg mice was significantly enhanced compared with that in WT mice.

Acetic acid solution (0.7%) was injected into peritoneal cavities of WT (dotted line, n = 9) and 8-24-week-old AsTg (thin line, n = 6) female mice, and WT (n = 4) and 10-12-week-old AsTg male mice (n = 4). After 10 min after placement, writhing response was counted every 5 min for 30 min. The data were represented as mean  $\pm$  SD and p values were calculated by ANOVA.

最初に簡便な炎症モデルである酢酸苦悶試験を利用した。具体的には、0.7%酢酸を腹腔内に投与し、10分後から30分まで5分間隔で苦悶反応を測定した。また、直接腹腔に酢酸を投与し即時反応を測定するため、腹腔マクロファージの定常状態での活性化の閾値が影響すると考えられた。図1にWT, AsTg マウスにおける酢酸苦悶反応の結果を示した。

(2) C57BL/6 マウスは、通常、コラーゲン誘発性リウマチモデルを作製することは困難である。しかし、C57BL/6 バックボーンのアディポネクチン anti-sense Tg mouse は、易炎症性であるため、上記モデルを作製可能であると推測している。具体的には、市販の抗II型コラーゲン抗体(0.5 mg/500  $\mu$ L)を腹腔に投与後、4日後に尾静脈へ抗コラーゲン抗体を投与し、その3日後に腹腔へLPS(50  $\mu$ g/0.1 mL)を投与する。関節炎は抗体を投与後24-48時間以内に発症し、6-8日目にピークに達し、14日目まで持続する。途中、7日目にLPS(50  $\mu$ g/0.1 mL)を投与する。関節炎の推移は四肢それぞれの腫脹の程度を関節炎スコアにより評価する。骨破壊の程度は21日目、28日目にCT (eXplore Locus) を用いて評価する。

(3) mRNA の発現量の定量は、TaqMan 法による Real-time PCR により行った。TNF- $\alpha$ , IL-6 等のサイトカインに対する TaqMan Primer and Probe sets は、Life Technology 社より購入した。

(4) Ca<sup>2+</sup>応答性は、以下の手順により測定した。調製したマクロファージを1,200 rpm で7 min 遠心。上清を除去し、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬である1mMFura-2AM 2.5  $\mu$ Lを含有する培地(10%FBS, 100 U/mL Penicillin, 100  $\mu$ g/mL Streptomycinを含有したD-MEM培地)500  $\mu$ Lでサンプルを再懸濁した。24 well cell culture plate の1 well に、あらかじめ2 mm $\times$ 10 mm のガラスプレートを2枚ずつセットしておき、細胞懸濁液を加え、37 $^{\circ}$ Cで40分間インキュベーションした(Fura-2の細胞内ロード)。インキュベーション後、細胞内Ca<sup>2+</sup>測定用緩衝液(2 mM Ca<sup>2+</sup> HANKS buffer) 中ガラスプレートを2分以上静置し

た。顕微鏡上の灌流チャンバーにセットし、緩衝液をフローすることによりガラスプレート上の細胞を洗浄（この操作で、ガラスプレート非吸着細胞は除去され、ガラス吸着性の強いマクロファージが残る）した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化は、340nm と 380nm の励起光を交互に照射し、生じた蛍光（510 nm）の強度を、蛍光画像解析システム Meta Flour（日本ローパー社）によって測定し、380 nm の励起光による蛍光強度に対する 340 nm の励起光による蛍光強度の比（340 nm/380 nm）で示した。

#### 4. 研究成果

図 1 で示すように、AsTg マウスは酢酸苦悶試験において WT マウスに比べ酸応答性が亢進していた。同様に、白色脂肪細胞からの炎症性サイトカインの産生も亢進していた。AsTg マウス由来マクロファージでは、Acid-sensing ion channels (ASICs) の発現が亢進しており（図 2）、それに伴い酸による  $\text{Ca}^{2+}$  応答性（delta ratio; 340/380 nm of (peak value – average basement value)）が亢進していた（図 3）。酸応答性 ASICs チャンネルは  $\text{Na}^+$  チャンネルであるが、連動する  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体により細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  流入が認められた。結果より、AsTg マウス由来マクロファージのチャンネル活性の閾値が低下しているものと考えられた。本研究は、炎症環境下（酸性下）では低 pH により免疫担当細胞であるマクロファージを活性化することを示した。また、活性化機序として酸感受性チャンネルである ASICs を介すること、活性化により炎症性サイトカイン  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 の産生を誘導することを証明した（図 4）。

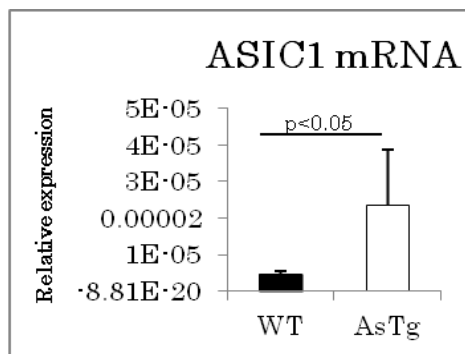


図 2. Enhanced mRNA expression of ASICs and NCXs in resident peritoneal M $\phi$  from AsTg mice compared with WT mice. Resident peritoneal M $\phi$  was recovered from peritoneal cavities of mice, and total RNA was harvested. The total RNA was converted to cDNA by reverse transcription and used as a template for real-time PCR. The genes TRPV1, ASIC2, ASIC5, NCX2, and NCX3 were

either not detected or only slightly detected. Filled bars show mRNA expression of WT mice (n = 4) and empty bars show that of AsTg mice (n = 6). The data are represented as the expression of target genes relative to  $\beta$ -actin (mean  $\pm$  SD); p values were calculated by ANOVA.

この結果は、現在論文投稿中(revised)であり国内外において低 pH によるマクロファージ活性化機構としては初めて報告したものである。

詳細なメカニズムはまだ解析中であるが、全身での低アディポネクチン状態が、生体内に微弱な炎症を惹起し ASICs チャンネル発現の亢進に関与していると推測している。

AsTg マウスを用いることにより、WT マウスでは検出しにくかったマクロファージの低 pH による活性化とその機序を明確にできたと考える。従って、炎症モデルを構築する際、AsTg マウスを利用することにより、より明確なメカニズムを解析できることが示唆された。現在、AsTg マウスにおいてコラーゲン誘発リウマチモデルを解析中である。

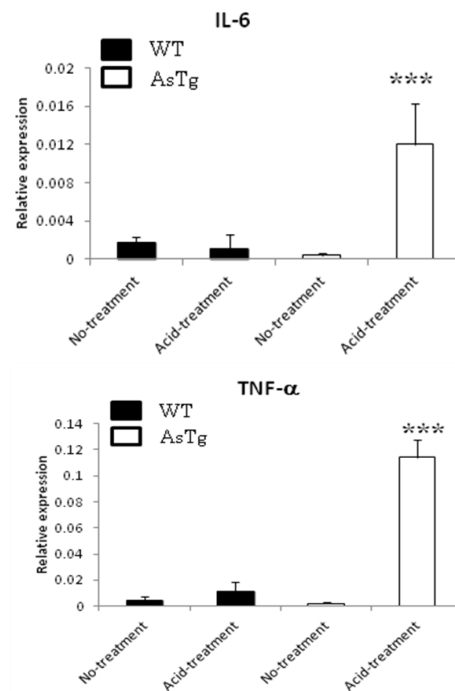


図 3. Differences in acid sensitivity of resident peritoneal M $\phi$  between WT and AsTg mice. Resident peritoneal M $\phi$  adhered to a glass coverslip were placed into a perfusion chamber and acid stimulation was performed by perfusing each with varying concentrations of acetic acid in HBSS for 10 min: 0.01%, 0.05%, 0.1%. All line graphs represent average data of 2-5 independent

experiments. Bar graphs indicate the delta ratio of each line graph (mean  $\pm$  SD). p values were calculated by ANOVA.

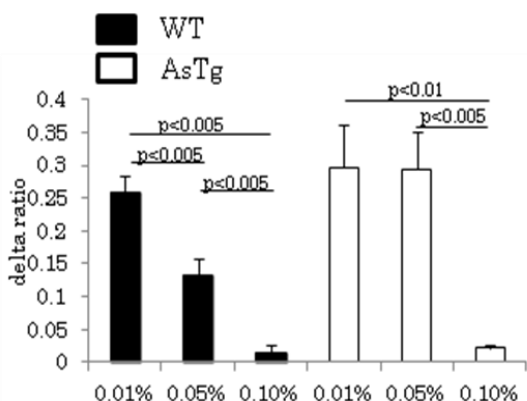


図 4. Changes in mRNA expression of cytokines in peritoneal Mφ from WT and AsTg mice after *in vivo* acid treatment. Acetic acid solution (0.7%) was injected into peritoneal cavities of WT or AsTg female mice. Two to three hours later the peritoneal Mφ were removed from the untreated and treated mice and solubilized in RNAiso Plus reagents. After reverse transcription, cDNAs of Mφ were used as templates for real-time PCR. The data are represented by the expression of target genes relative to  $\beta$ -actin (mean  $\pm$  SD); the number of mice was as follows: WT: no treatment (n = 4), acid treatment (n = 4); AsTg: no treatment (n = 5), acid treatment (n = 4). p values were calculated by ANOVA. また、低アディポネクチン環境下での T, B 細胞の分化への影響も現在検討中である。上述したように、肥満などの特殊な環境下では微弱な炎症が慢性化し、全身で低アディポネクチン値を呈している。ヒトの慢性炎症性疾患である喘息患児の研究では、肥満を有する患児がより重症化しやすいという報告もある。そこで、喘息患児末梢血中の T 細胞の動態を解析し論文として報告した。継続して、血中アディポネクチン濃度との関係を検討中である。

##### 5. 主な発表論文等

- 1) Y. Yamamoto, T. Negoro, A. Hoshi, A. Wakagi, S. Shimizu, A. H. Banham, M. Ishii, H. Akiyama, Y. Kiuchi, S. Sunaga, T. Tobe, G. Roncador, K. Itabashi, and Y. Nakano  
Impaired Ca<sup>2+</sup> regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from pediatric asthma.  
*Int Arch Allergy Immunol* (2011); 156:

148-158.

- 2) Participation of Th17 and Treg cells in pediatric bronchial asthma.  
Y. Yamamoto, T. Negoro, A. Wakagi, A. Hoshi, A. H. Banham, Gi. Roncador, H. Akiyama, T. Tobe, S. Sunaga, Y. Nakano, and K. Itabashi  
(*J. Health. Sci.* 56: 589-597. 2010)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 嶋田 紘也 他: LPS による炎症誘導時の HMW アディポネクチンの機能/ The effect of HMW adiponectin in RAW264.7 under inflammation induced by LPS  
第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月、神戸)
- 2) Akitoshi Takuma 他: アディポネクチンの抗炎症作用機序解析 (続報) /Influence of adiponectin on functions of macrophages (followup report)  
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (2009 年 12 月、大阪)
- 3) Haruyo Akiyama 他: The role of ectopically-expressed adiponectin in rheumatoid arthritis.  
14th ICI 2010 annual meeting, 22-27/Aug/2010, Kobe, Japan
- 4) Takaharu Negoro 他: Effect of adiponectin on macrophage via the pH sensor.  
14th ICI 2010 annual meeting, 22-27/Aug/2010, Kobe, Japan
- 5) 嶋田紘也 他: 関節リウマチにおけるアディポネクチンの炎症病態への影響  
第 60 回 日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 東京

##### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
根来 孝治 (NEGORO TAKAHARU)  
昭和大学・薬学部・講師  
研究者番号: 70218270
- (2) 研究分担者  
中野 泰子 (NAKANO YASUKO)  
昭和大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20155790

斎藤 清美 (SAITO KIYOMI)  
昭和大学・薬学部・助教  
研究者番号: 70307065