

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890197

研究課題名（和文）2型糖尿病と動脈硬化の共通機序としてのマクロファージ増殖と表現型の検討

研究課題名（英文）Common roles of macrophage proliferation and polarization in type 2 diabetes and atherosclerosis.

研究代表者

瀬ノ口 隆文 (SENOKUCHI TAKAFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教

研究者番号：00530320

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病のモデルである db/db マウスでは膵島への炎症性 M1 マクロファージ (M $\phi$ ) 浸潤が増加しており、2型糖尿病における膵島機能異常に M1M $\phi$  の関与が示唆された。スカベンジャー受容体プロモーター下に p27 を配した M $\phi$  増殖抑制トランスジェニックマウス (SRA-hp27Tg) を作製した。しかし Tg マウスはオス、メスともに妊孕性が失われていた。Tg の骨髄由来 M $\phi$  では p27 の発現が増加し、増殖が抑制されていた。M $\phi$  特異的 p27 発現の妊孕能への影響は今後の検討課題である。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory M1 macrophage infiltration into pancreatic islets in diabetic model db/db was significantly increased, which suggested the implication of M1 macrophage in b cell dysfunction in type 2 diabetes. We generated the transgenic mouse containing p27 cDNA under the control of scavenger receptor promoter, which is macrophage-specific proliferation restricted mouse. However both male and female of this mutant mouse were infertile. The p27 mRNA expression was significantly increased in bone marrow-derived macrophage from Tg mice, and the proliferation of these macrophages were restricted. The effect of p27 expression in macrophage on infertility will be another project to be studied farther.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：代謝内科学、生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：2型糖尿病、動脈硬化、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化の発症、進展のメカニズムは内皮傷害を起点とした血管の炎症反応として理解され、血管内皮下に浸潤したマクロフ

ァージが重要な役割を果たす。一方、2型糖尿病の病態は、細胞からのインスリン分泌と末梢のインスリン抵抗性とのバランスにおける相対的インスリン作用の欠如と理解

される。これまでにマクロファージ浸潤と糖尿病病態への関与については、脂肪組織へ浸潤したマクロファージの炎症反応によるインスリン抵抗性の増加や、2型糖尿病患者および糖尿病モデルマウスの膵島へのマクロファージの浸潤によるインスリン分泌能への影響などが報告されている。

動脈硬化の進展にはマクロファージの炎症反応ばかりではなく、マクロファージの増殖、アポトーシス、貪食能等の関与も重要視されており、申請者らはマクロファージ増殖の分子メカニズムやマクロファージの機能制御による抗動脈硬化作用の機序、さらにはマクロファージアポトーシス誘導による動脈硬化促進のメカニズムを明らかにし、マクロファージの機能が多岐にわたって病態に関与していることを報告している。さらにマクロファージは古典活性化マクロファージ (M1) や代替活性化マクロファージ (M2) といった表現型の異なるマクロファージが存在し、動脈硬化病変の進展や、インスリン抵抗性において異なった役割を果たしている可能性を示唆する報告が相次いでいる。

これらの知見から、血管内皮下へのマクロファージ浸潤と脂肪組織や膵島へのマクロファージ浸潤が共通のメカニズムで制御され両疾患の発症・進展に関与している可能性が考えられる。マクロファージ表現系とマクロファージ機能、および動脈硬化や2型糖尿病の病態との関連に関しては未だ明らかとされていないことが多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、動脈硬化と2型糖尿病における共通機序としての浸潤マクロファージの果たす役割の検討を目的とする。特にマクロファージ表現型 (M1、M2) の関与と浸潤マクロファージ増殖の両疾患の病態における影響を中心に検討を行う。マクロファージ表現

型のコントロールによる浸潤マクロファージの増殖抑制が両疾患の発症・進展に対する効率的な治療法となり得る新しい概念を提唱し、さらに動脈硬化病変および膵島におけるマクロファージ浸潤、増殖が共通の機序として動脈硬化、2型糖尿病の病態へ関与することを示すことによって、マクロファージ増殖の制御による両疾患の発症・進展抑制の可能性を明らかにしてゆくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病の病態とマクロファージの膵島浸潤に関する検討

2型糖尿病モデルマウスとして、db/db マウス、KKAy マウスを用い、マクロファージの膵島浸潤について検討した。これらのマウスより膵臓を摘出、凍結包埋後組織切片を作成した。抗 CD68 抗体を用いた免疫染色により膵島浸潤マクロファージの総数を評価し、抗 CD206 抗体を用い M2 マクロファージの染色を行った。マクロファージ総数と M2 マクロファージ数の差を M1 マクロファージと評価した。膵島内への浸潤マクロファージ (Intra-islet) について単位膵島面積当たりのマクロファージ数で評価した。

### (2) 動脈硬化と2型糖尿病の共通メカニズムとしてのマクロファージ増殖の検討

増殖抑制因子である p27<sup>kip</sup> をマクロファージ特異的に発現する、マクロファージ特異的 p27<sup>kip</sup> トランスジェニックマウスを作製しマクロファージ増殖抑制による糖尿病、動脈硬化の発症、進展への効果を検討する。

#### ① マクロファージ特異的 p27<sup>kip</sup> 発現コンストラクトの作成

Flag-human p27<sup>kip</sup> (hp27<sup>kip</sup>) プラスミド (九州大学生体防御医学研究所 中山敬一先生より供与) より切出した flag-hp27<sup>kip</sup> cDNA を、マクロファージ特異的プロモーター (human SR-A promoter) を持つプラスミド

(pAL-1) (University of California San Diego Dr. Christopher k. Glass より供与) に遺伝子組み換えを行い、flag-hp27<sup>kip</sup> をマクロファージ特異的に発現するプラスミドを作成した。マウスマクロファージ系細胞株 (RAW264.7 cell) に作成したプラスミドを用いて遺伝子導入を行った後、flag-hp27<sup>kip</sup> の発現確認を行った。

② マクロファージ特異的 flag-hp27<sup>kip</sup> 発現コンストラクトを用いたトランスジェニックマウス (Tg) の作成

作成したプラスミドより human SR-A promoter および hp27<sup>kip</sup> を含む配列を切出し、PCR、制限酵素切断による確認を行った後、このコンストラクトを用いトランスジェニックマウスの作成を行った。トランスジェニックマウスの作成にあたっては、熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門の協力を得た。

③ トランスジェニックマウスの解析

F0 Tg オスの 2 匹を屠殺し、臓器の肉眼的解剖、骨髓細胞の採取を行った。骨髓細胞は M-CSF 存在下の培養液で培養しマクロファージへの分化誘導を行い、生細胞数の評価による細胞増殖能の検討、および total RNA を採取し、Q-PCR によって mRNA 発現を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 糖尿病の病態とマクロファージの膵島浸潤に関する検討

2 型糖尿病のモデルとして db/db マウスおよび KKAy マウスの膵島におけるマクロファージ浸潤と表現型 (M1、M2) について免疫組織学的に検討を行った。10~12 週齢の db/db マウス (n=5)、KKAy マウス (n=5) は体重、随時血糖値、随時血清インスリン値のいずれも対象群 (control) に比し有意に増加し、高度のインスリン抵抗性、高血糖を示した (図 1)。

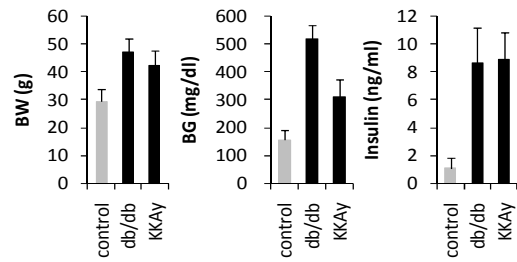


図 1: 2 型糖尿病モデルマウスの体重、血糖、血清インスリン値

これらのマウスの膵切片において、浸潤マクロファージ総数の評価のために CD68 に対する免疫染色を行ったところ、対象群で膵島内 (Intra-islet) に単位面積 (mm<sup>2</sup>) 当たり 19.7 個の CD68 陽性マクロファージの浸潤を認めたのに対し、db/db マウスでは 234.5 個、KKAy マウスでは 240.0 個と浸潤マクロファージ数が有意に増加していた (図 2)。

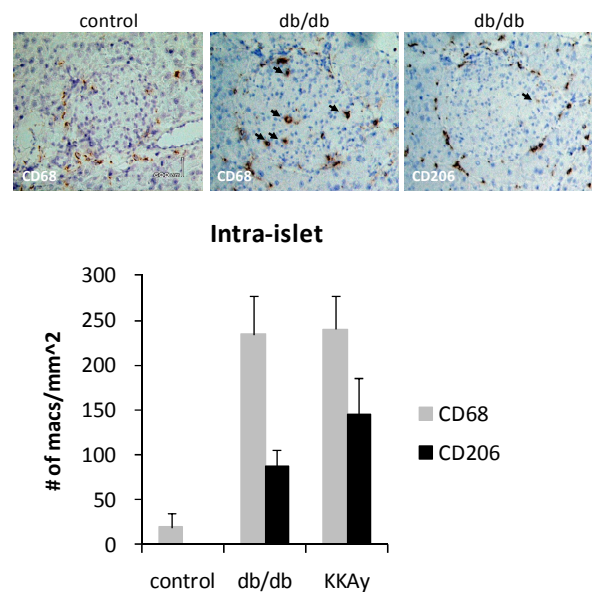


図 2: 膵島浸潤マクロファージの定量

また、単離した膵島より mRNA を精製し、遺伝子発現を検討したところ、CSF-1 受容体、CD68、F4/80 といったマクロファージ特異的遺伝子の発現が db/db マウス、KKAy マウス膵島で有意に増加していた (図 3)。

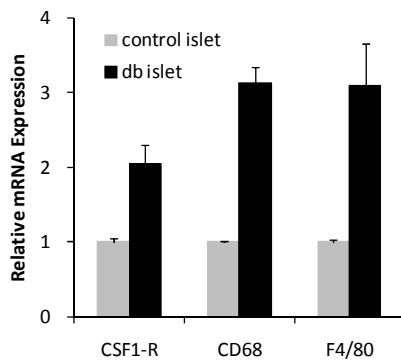


図 3：膵島におけるマクロファージ特異的遺伝子発現

このことから 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウス、KKAy マウスの膵島にはマクロファージ浸潤が増加していることが明らかとなった。さらにこれらのマウスの膵切片を M2 マクロファージのマーカーである CD206 に対し免疫染色を行い定量化すると、db/db マウスの膵島では 37.0%、KKAy マウスの膵島では 60.1% が M2 マクロファージであった。これらの結果より、膵島へのマクロファージ浸潤の増加が 2 型糖尿病の発症機序に関与している可能性が示唆されたが、マクロファージの膵島浸潤や M1/M2 の表現系の変化がどのように病態に関わるかといった点についての検討には至っていない。

#### (2) 動脈硬化と 2 型糖尿病の共通メカニズムとしてのマクロファージ増殖の検討

組織へ浸潤したマクロファージの増殖が動脈硬化や糖尿病の発症、進展へどのように関与するかを検討するためにマクロファージ増殖抑制マウスを作製した。

#### ④ マクロファージ特異的 p27<sup>kip</sup> 発現コンストラクトの作成

human p27<sup>kip</sup> (hp27<sup>kip</sup>) プラスミドより切出した hp27<sup>kip</sup> cDNA を、マクロファージ特異的プロモーター (human SR-A promoter) を持つプラスミド (pAL-1) に遺伝子組み換えを行い、hp27<sup>kip</sup> をマクロファージ特異的に遺伝

子発現を誘導するプラスミドを作成した (pAL-hp27)。コンストラクトの配列はシーケンス解析で塩基配列を確認し、作動性についてはマウスマクロファージ系細胞株 (RAW264.7 cell) へプラスミドを遺伝子導入後に hp27<sup>kip</sup> の mRNA、タンパク質発現によって確認を行った。

エレクトロポレーション法を用い遺伝子導入を行った RAW 細胞を 48 時間培養し、total RNA およびタンパク質を回収した。Real time RT-PCR を行い hp27<sup>kip</sup> の mRNA 発現を検討した。プライマーは前後のプライマーを hp27<sup>kip</sup> 配列中に設計したもの (p27 L2R2) と、前プライマーを FLAG 配列中に設計した (flag p27 L1R2) 2 種類を用い PCR 反応を行った。いずれのプライマーを用いた場合も mRNA 発現の増加を認め、特に flag p27 L1R2 による増幅によって外来性のプラスミドによって発現が誘導されていることが確認された。さらに、マクロファージ特異的プロモーター (human SR-A promoter) の作動性を検討するために、マクロファージにおいて SR-A (Scavenger receptor Type A) の発現を誘導するアセチル LDL (Acetylated LDL; AcLDL) に対する遺伝子発現を検討した。遺伝子導入した RAW 細胞を AcLDL (20 μg/ml) で 12 時間刺激したところ、hp27<sup>kip</sup> の発現がさらに増加したことから SR-A プロモーターの調節下に hp27<sup>kip</sup> が発現していることが確認された。さらに、回収したタンパク質のサンプルを用いてウェスタンブロットを行ったところ、pAL-hp27 の遺伝子導入によって hp27<sup>kip</sup> タンパク質発現の増加が見られたことから、このコンストラクトが SR-A プロモーターの調節下に hp27<sup>kip</sup> の mRNA およびタンパク質を発現することが確認された (図 4)。

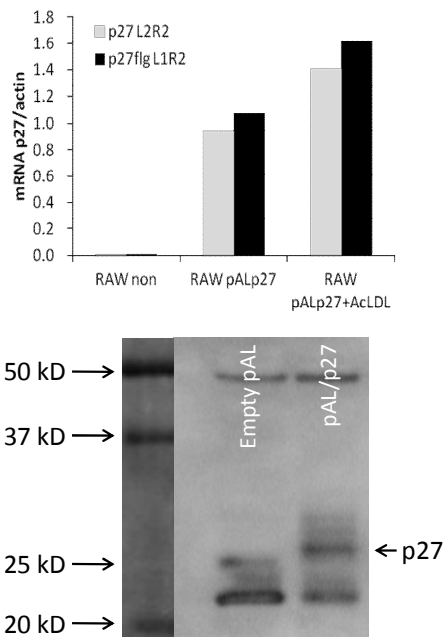


図4：コンストラクトの確認

#### ⑤ トランスジェニックマウスの作成

作成したプラスミドより human SR-A promoter および flag-hp27<sup>kip</sup> を含む配列を切出し、制限酵素切断による確認ののち、このコンストラクトを用いトランスジェニックマウスの作成を行った。トランスジェニックマウスの作成にあたっては、熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門の協力を得た。

上記のコンストラクトを受精卵にマイクロインジェクションし、60 匹の産仔を得た。切断した尾の先端よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法によるジェノタイプングを行った結果、オス 12 匹 (Tg F0 : Line 1-12)、メス 4 匹 (Tg F0 : Line 13-16) のトランスジーン陽性マウスを得た。

これらの Tg マウスが 8 週齢となったところで、同週齢程度の野生型マウス (WT ; C57BL6J) との交配を行った。しかし、Tg F0 のオスを野生型メスと交配させたところ、Tg F0 のオスは 1 匹も WT メスを妊娠させることができず、その後 WT メスを変えるなどして

交配を行ったが、産仔を得ることはなく hp27 Tg のオスは不妊であることが明らかとなった。また Tg F0 のメスと WT オスとの交配では、Tg F0 メスの 4 匹のうち 3 匹 (Line 13-15) は妊娠、出産はするものの、産仔の数は少なく、ほとんどの仔は生後まもなく死んでしまった。Tg F0 メスと WT オスとの交配を繰り返しても同様の結果であり Tg のメスもある程度の妊孕性はあるものの胎児発育あるいは胎児自体に重大な異常がある可能性が示唆された。しかしながら Tg F0 メスの 1 匹のみ (Line 16) は 8 匹 (オス 6 匹、メス 2 匹) の仔を出産しそのうちオスの 3 匹がトランスジーン陽性であることが確認された。Tg F0 メスの妊孕性の違いはトランスジーンのコピー数やゲノム上の挿入部位に関連する可能性が考えられるが、これらの点についての検討には至っていない。

#### ⑥ トランスジェニックマウスの解析

Tg F0 オスが不妊であることから Tg F0 オスの 2 匹 (Line 1, 2) を屠殺し、骨髄細胞を採取、培養した。まず肉眼的な臓器の観察で、Tg マウスの精嚢腺が両側ともに著明に過大していることが確認された。また Line 2 の左の精嚢腺腹腔は茶褐色に色調も変化しており、オスの不妊に関連した異常があることが示唆された。

採取した骨髄細胞を M-CSF 含有細胞培養液中で培養し、マクロファージへの分化誘導、増殖能を検討した。培養開始 3 日、5 日、10 日後の hp27<sup>kip</sup> 遺伝子発現と 3 日、5 日、7 日後の生細胞数を検討した。分化開始 3 日後の WT の p27 の発現に比し、マクロファージへの分化誘導 3 日目にコントロールに比し Tg で p27 mRNA の発現は 46 倍、5 日目には 314 倍と増加し、分化に伴って p27 の発現が誘導されていた。

生細胞数を Cell counting assay で評価し

たところ M-CSF 存在下での培養によって WT のマクロファージは増殖し、生細胞数が有意に増加するが、Tg マクロファージでは増殖が有意に抑制されることが確認された (図 5)。

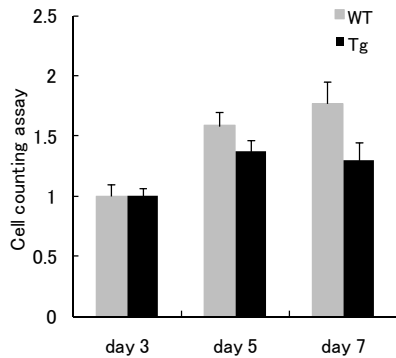


図 5 : Tg マウスマクロファージ増殖は抑制される

これらの結果から、Tg マウスのマクロファージには p27 が発現し、マクロファージの増殖能が抑制されており、目的のマウスが作成されたことを確認した。

しかしながら、これらの Tg マウスは 1 つの Line を除き、オス、メスともに妊孕性に乏しく産仔が得られないことから、Line 間の比較や糖尿病、動脈硬化に関連する検討には至らなかった。現在、唯一継代が可能である Line 12 について繁殖を行っており、マクロファージにおける p27 発現と増殖に対する表現型の確認ができれば、骨髄移植法を用い、マクロファージ増殖能が耐糖能や動脈硬化の発症・進展にいかに関与するかの検討を行うことが可能であると考え。また、このトランスジェニックマウスはマクロファージフェージ特異的に p27 の発現を試みたマウスであったが、それによって妊孕性が失われることに関しては、生殖器の発生や機能、胎児の発生においてマクロファージがなんらかの重要な役割を示唆する結果であり大変興味深く、今後、本研究課題とは別の形で新たなマクロファージの生理的機能を提唱すべく検

討を進めてゆきたい。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬ノ口 隆文 (SENOKUCHI TAKAFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教

研究者番号 : 00530320

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

山縣 和也 (YAMAGATA KAZUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号 : 70324770

松村 剛 (MATSUMURA TAKESHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号 : 20398192

菰原 義弘 (KOMOYAMA YOSHIHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号 : 40449921