

## 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：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790853

研究課題名（和文）脂肪組織マクロファージとインスリン感受性の関与についての研究

研究課題名（英文）

Association of insulin sensitivity and adipose tissue macrophages

研究代表者

藤坂 志帆 (FUJISAKA SHIHO)

富山大学・大学病院・医員

研究者番号：30512082

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し、代謝疾患の発症を促進する。本研究によって我々は、PPAR $\gamma$ 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. In this study, I found that telmisartan, an angiotensin II type I receptor blocker, improved insulin resistance with its PPAR $\gamma$  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
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

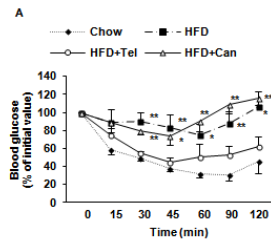
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：肥満・脂肪組織・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

肥満に伴うインスリン抵抗性の発症には脂肪組織に浸潤するマクロファージが深く関与する。このマクロファージには、インスリン抵抗性を誘導する炎症性の M1 マクロファージ(M1 $\phi$ )と、そうでない抗炎症性の M2 マ

クロファージ(M2 $\phi$ )の少なくとも 2 種類が存在する。我々は、マウス内臓脂肪組織 M1/M2 $\phi$  をフローサイトメトリーを用いて明確に分離し、これらの分布状態とその個体のインスリン感受性との関連について報告してきた。すなわち、M1 $\phi$  は、M2 $\phi$  と比較



して、TNF $\alpha$ やIL-6など炎症性サイトカインの発現レベルが高く、M2 $\phi$ はIL-10など抗炎症性サイトカインの発現レベル

が高い。正常マウスの内臓脂肪組織では90%以上がM2 $\phi$ であるのに対し、高脂肪食投与し肥満したマウスではM1 $\phi$ の数は約120倍に増加、一方M2 $\phi$ の増加は約9倍にとどまり比率はM1 $\phi$ 優位となった。さらに高脂肪食負荷肥満マウスにインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン投与すると、インスリン抵抗性改善と同時に比率はM2 $\phi$ 優位に変化した。M1/M2 $\phi$ の数や比率の変化がその個体のインスリン感受性と深く関連することを報告した(Diabetes 58: 2574-2582, 2009)。

M1/M2 $\phi$ の分化誘導因子としてはいくつかのものが知られていた。in vitroにおいてはTh1サイトカインがM1 $\phi$ を、Th2サイトカインがM2 $\phi$ を誘導する(Trends Immunol. 25: 677-686, 2004, Cell Metab. 7: 485-495, 2008)。またin vivoにおいてはPPAR $\gamma$ やPPAR $\beta/\delta$ などの転写因子がM2 $\phi$ を誘導する(Nature 447: 1116-1121, 2007, Cell Metab. 6: 137-143, 2007)。しかしこれらの関与は部分的である。M1/M2 $\phi$ の誘導因子をより明らかにすること、またすでにある薬剤の中でもこれらの因子に良い影響を与える薬剤を見つけることが、今後のメタボリック症候群の治療ターゲットの一旦を担うと考えられる。

肥満すると脂肪組織が低酸素状態となることが知られていた(Am J Physiol Endocrinol Metab. 293: E1118-E1128, 2007)。また我々の検討により、M1 $\phi$ はM2 $\phi$ よりHIF1 $\alpha$ 、VEGFA、Glut1をはじめとする低酸素関連の遺伝子発現レベルが亢進していることがわかっていた。さらにM1 $\phi$ は嫌氣的代謝のマーカであるPDK1の発現レベルが高く、M2 $\phi$ は好氣的代謝を促進するPGC1 $\beta$ の発現レベルが高かった。これらの結果から、肥満に伴って低酸素状態にある脂肪組織に強く浸潤してくるM1 $\phi$ はそれ自体嫌氣的代謝をしており、その分化誘導因子に低酸素が関与していると考えられる。一方、痩せた個体の脂肪組織にも常在するM2 $\phi$ は好氣的代謝をしているのではないかと仮説に至った。

一方で、以前我々は、降圧剤の中でもとくに、PPAR $\gamma$ 活性化作用を有することで知られるアンジオテンシン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 $\phi$ 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。

## 2. 研究の目的

脂肪組織M1/M2 $\phi$ とインスリン感受性との関連について、これまで知られていない機構を明らかにすること、すなわち、

(1) PPAR $\gamma$ 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ジオテンシンII受容体拮抗薬、テルミサルタンが、脂肪組織M1/M2 $\phi$ に与える影響を明らかにすること。

(2) 脂肪組織M1/M2 $\phi$ における低酸素の関与を明らかにすること。  
である。

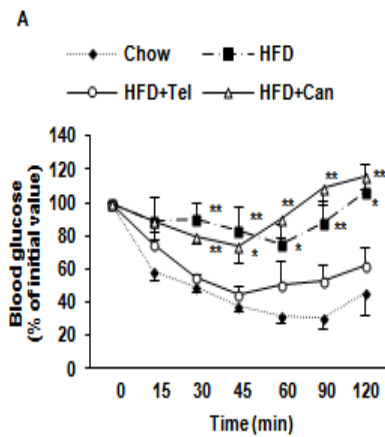
## 3. 研究の方法

(1) 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、精巢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。また精巢上体脂肪組織のM1/M2 $\phi$ を免疫組織染色及び、フローサイトメトリーで解析した。

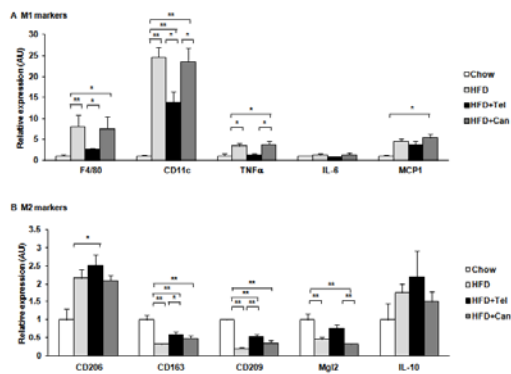
(2) 普通食または高脂肪食投与したマウスの脂肪組織を採取し遺伝子発現レベルをRT-PCR法で解析した。M1/M2 $\phi$ について、フローサイトメトリーで比較した。また低酸素マーカーであるピモニダゾールを60mg/kg腹腔内投与し、30分後に脂肪組織を採取し、免疫組織染色、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーで解析した。マウス骨髄由来マクロファージまたは精巢上体脂肪の間質細胞(stromal vascular fraction)を1%O $_2$ の低酸素培養器で培養し、遺伝子発現レベルをRT-PCR法で検討した。

## 4. 研究成果

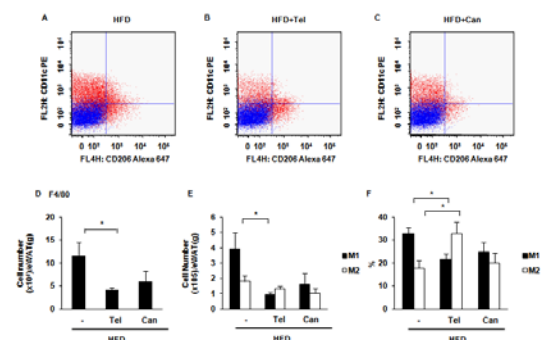
(1) テルミサルタンは血圧を低下させ、摂餌量を変えずに高脂肪食投与期間中の体重増加を抑制した。内臓脂肪である後腹膜脂肪の量を減少させ、脂肪細胞のサイズを縮小した。またインスリン負荷試験において、高脂肪食投与によるインスリン抵抗性優位に改善した。



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 $\alpha$  など M1  $\phi$  のマーカー遺伝子を減少させ、CD163、CD209 など M2  $\phi$  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  $\phi$  の数と比率を低下させ、逆に M2  $\phi$  の比率を上昇させることがわかった。

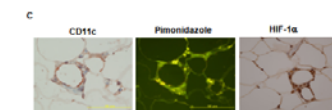
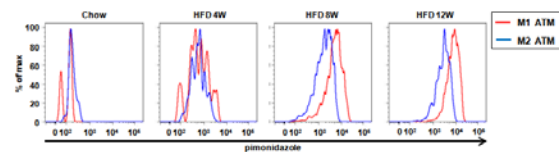


このとき PPAR $\gamma$  の標的遺伝子である Adiponectin や PEPCK などの遺伝子発現は増加していた。

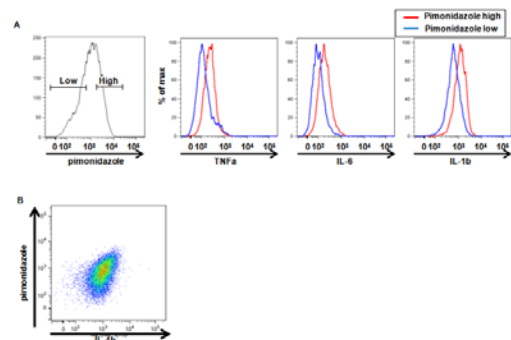
これらの結果から、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるテルミサルタンは、降圧作用のみならず、PPAR $\gamma$  活性化作用を介して肥満マウスの内臓脂肪組織における炎症性 M1  $\phi$  を減少させ、抗炎症性 M2  $\phi$  の比率を増加させることで、内臓脂肪組織の炎症を軽減し、イ

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)。

(2) 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  $\phi$  で遺伝子発現の相違を探索すると、M1  $\phi$  では HIF1 $\alpha$ 、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 $\alpha$  の発現レベルの上昇が著しく、VEGF、MIF、Hmox1 など複数の HIF-1 $\alpha$  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  $\phi$  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  $\phi$  と M2  $\phi$  の低酸素レベルを比較すると、肥満状態では M1  $\phi$  が M2  $\phi$  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。

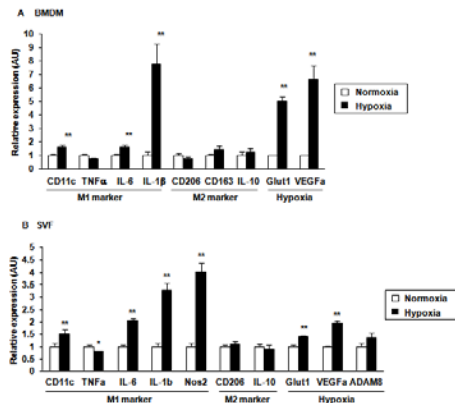


さらに、ピモニダゾールの取り込みが強い脂肪組織マクロファージは、弱いマクロファージより TNF $\alpha$  や IL-6 など炎症性サイトカインのレベルが高いことをフローサイトメトリーで確認した。



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  $\phi$  は M2  $\phi$  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  $\phi$  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%O<sub>2</sub>)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。

## 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 3 件)

① Watanabe 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

② Fujisaka S., Usui I., Kanatani Y., Iikutani 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

③ Suzuki 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 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II α (Thr286 Asp) transgenic mice. *Diabetologia* 2011;54:2953-2962. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 藤坂 志帆、肥満内臓脂肪組織の低酸素環境と M1/M2 マクロファージの関連についての検討、日本臨床免疫学会 Midwinter Seminar 2012、2012 年 2 月 9 日、沖縄

② Shiho 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, USA

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 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

⑤ 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、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 27 日、岡山

[図書] (計 3 件)

① 藤坂 志帆、メディカルレビュー社、*The Lipid*、2011 年、5 ページ

② 藤坂 志帆、医学書院、*medicina*、2010 年、6 ページ

③ 藤坂 志帆、北隆館、*Bio Clinica*、2010 年、5 ページ

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤坂 志帆 (FUJISAKA SHIHO)

富山大学・大学病院・医員

研究者番号：30512082

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：