

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591316

研究課題名(和文)ジペプチジルペプチダーゼ-4阻害による脂肪細胞機能制御

研究課題名(英文)Regulation of adipocyte function by inhibition of dipeptidyl peptidase-4

研究代表者

木村 真理 (KIMURA, Mari)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：40363840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：スクロースとリノール酸とを組み合わせた食事による糖脂肪毒性モデルを確立することに成功し、DPP-4阻害薬は膵島以外にも、脂肪組織および肝臓と多臓器における食事誘導性の糖脂肪毒性に改善作用を持つことを証明した。膵島に対してはGLP-1を介した小胞体ストレスおよびアポトーシスからの保護、肝臓に対してはGLP-1を介した脂肪合成系酵素発現調節による肝臓内脂肪蓄積の抑制、脂肪組織に対してはDPP-4酵素活性阻害によるリンパ球・マクロファージの機能修飾の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the extra-pancreatic effects of DPP-4 inhibition on visceral fat and the liver. The epididymal fat weight was significantly higher in beta-cell-specific glucokinase haploinsufficient (Gck+/-) mice fed a diet containing a combination of sucrose and linoleic acid (SL) than in mice fed a diet containing a combination of sucrose and oleic acid (SO). Compared with SO, SL increased the numbers of CD11c+ M1 macrophages and CD8+ T cells in visceral adipose tissue. DPP-4 inhibition significantly prevented adipose tissue infiltration by CD8+ T cells and M1 macrophages and decreased the expression of PAI-1. DPP-4 inhibition also prevented fatty liver in both wild-type mice and Gck+/- mice. DPP-4 inhibition also decreased the expressions of SREBP-1c, SCD-1 and FAS and increased the expression of PPARalpha in the liver. Thus, DPP-4 inhibition has extra-pancreatic protective effects against diet-induced adipose tissue inflammation and hepatic steatosis.

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：ジペプチジルペプチダーゼ-4 膵島 マクロファージ 遊離脂肪酸 内臓脂肪 インクレチン インスリン

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪は、生体内で最大の内分泌臓器として知られており、糖代謝・脂質代謝において膵島、肝臓および筋肉とともに中心的な役割を果たしている。肥満、メタボリックシンドロームや糖尿病におけるインスリン抵抗性において、内臓脂肪肥大や炎症細胞浸潤による内臓脂肪の炎症が主な原因であることが報告され、内臓脂肪への炎症細胞の浸潤を抑制はこれらの治療につながる。しかし、内臓脂肪の炎症を担うマクロファージやT細胞がどのように脂肪組織に浸潤していくかは不明な点が多く、その詳細なメカニズムの解明は重要な課題である。

2. 研究の目的

我々は、脂肪組織への炎症細胞浸潤による炎症惹起において DPP-4 阻害薬により脂肪組織へのマクロファージやT細胞の浸潤が抑制されることを見出したが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究の目的は、これらの分子メカニズムを明らかにすることであり、具体的な研究目的として、以下の項目を掲げた。

- (1) 脂肪炎症モデルマウスにおける内臓脂肪間質分画の細胞属性の解明
- (2) 動物由来の内皮細胞、マクロファージ、T細胞および脂肪細胞株への DPP-4 およびインクレチンの作用解析
- (3) クレチンによる脂肪組織炎症抑制と他臓器との関連性
- (4) DPP-4 欠損マウスを用いた内臓脂肪炎症抑制メカニズムの解析
- (5) DPP-4 阻害による内臓脂肪炎症抑制の臨床応用

3. 研究の方法

(1) 内臓脂肪炎症モデルマウスにおける内臓脂肪間質分画の細胞属性の解明

肥満型内臓脂肪炎症モデルマウスにおいて野生型マウスと比較して脂肪組織への M1 マクロファージおよび CD8 陽性 T 細胞浸潤が増大していることを示しているが、その詳細な脂肪組織における細胞属性は不明である。脂肪組織をコラゲナーゼにて消化し、脂肪細胞分画と間質分画 (SVF: stromal vascular fraction) に分離してフローサイトメトリー法により、マクロファージ (CD11b、F4/80)、M1 マクロファージ (CD11c)、M2 マクロファージ (CD206、CD209)、T 細胞 (CD3) および T 細胞分画 (CD4、CD8) を確認し、野生型マウスおよび普通食群と比較した。これらの解析により、内臓脂肪における細胞集団を明らかにし、さらには DPP-4 阻害による内臓脂肪炎症抑制において鍵となる細胞集団を同定した。

(2) 動物由来の内皮細胞、マクロファージ、

T 細胞および脂肪細胞株への DPP-4 およびインクレチンの作用解析

高脂肪食負荷後の肥満マウスや、肥満・糖尿病モデルマウスである db/db マウスの内皮細胞、マクロファージ、T 細胞を単離し初代培養系において DPP-4 阻害薬、可溶性 DPP-4、GLP-1 受容体作動薬を加え、mRNA およびタンパクを抽出し、遺伝子発現およびタンパク発現を解析した。また、炎症性サイトカインの産生等を ELISA にて確認する。血管内皮はコラゲナーゼ消化により単離培養し、T 細胞は、脾臓、リンパ節より抗体付着ビーズを用いて単離した。マクロファージは、腹腔内洗浄により単離する。さらに脂肪細胞株の培養細胞系を用いて脂肪組織に対する DPP-4 阻害薬、可溶性 DPP-4、GLP-1 受容体作動薬の効果も同様に検証した。

特に、インスリンシグナル分子である IRS-2 のリン酸化や発現変化を中心にインクレチンとインスリンシグナルとの関連性を検証した。また可溶性 DPP-4 を用いることにより、細胞膜型の DPP-4 の効果も解析した。

一方、2型糖尿病患者の膵島では、マクロファージの浸潤が健常者より多く認められることが報告されている。しかし、膵島へのマクロファージの浸潤と膵細胞機能障害との関連性は、未だ不明な点も多い。膵島浸潤マクロファージが膵島に及ぼす影響を明らかにした。野生型マウスの腹腔マクロファージを接着させ、その同じ培養液中で、メッシュにて隔離した野生型マウス単離膵島も培養し、単離膵島とマクロファージの共培養系を確立した。そこへ、TLR4 を活性化する遊離脂肪酸であるパルミチン酸や低用量の LPS を添加し、膵島およびマクロファージにおける mRNA 発現変化について解析した。

(3) インクレチンによる脂肪組織炎症抑制と他臓器との関連性

インクレチンは、膵細胞だけでなく、視床下部、消化管運動、肝臓、心臓骨格筋、神経細胞、免疫系細胞に作用することが報告されており、2型糖尿病モデルマウスを用いて DPP-4 阻害薬による脂肪組織の炎症過程への効果を示したが、これが他臓器へのインクレチン作用に依存しているか検討した。

(4) DPP-4 欠損マウスを用いた内臓脂肪炎症抑制メカニズムの解析

DPP-4 欠損マウスが既に報告されており、耐糖能の改善が報告されている。しかし、DPP-4 欠損マウスにおける内臓脂肪炎症に関する表現型は未だ報告されていない。DPP-4 欠損マウス(東京大学医科学研究所との共同研究)を用いて、高脂肪食負荷による内臓脂肪炎症を惹起させ、野生型マウスと比較する。内臓脂肪重量、内臓脂肪組織への細胞浸潤の解析(免疫組織染色、フローサイトメーター、遺伝子発現、タンパク発現、サイ

トカイン定量等による解析)を行い、DPP-4欠損による内蔵脂肪炎症の抑制効果を検証した。また、DPP-4欠損による内蔵脂肪炎症抑制における責任臓器(責任細胞)を明らかにした。

また、DPP-4欠損マウスに、DPP-4阻害薬やGLP-1受容体活性化薬を投与して、DPP-4を介さないDPP-4阻害薬の効果(DPP-4以外の標的に対する効果)や、内因性インクレチンに加えてのインクレチンの効果も検証した。

(5) DPP-4阻害による内蔵脂肪炎症抑制の臨床応用

内蔵脂肪の炎症は糖尿病や肥満の増悪因子であり、PAI-1は血栓形成、動脈硬化の原因となる内蔵脂肪由来の炎症性サイトカインである。ヒトにおいても遊離脂肪酸投与より内蔵脂肪および血清でのPAI-1が上昇するとともに内蔵脂肪の炎症が引き起こされることが報告され、また肥満患者、糖尿病患者では血清のPAI-1濃度が有意に上昇していることが知られている。DPP-4阻害薬を内服していない2型糖尿病患者においてDPP-4阻害薬使用前と使用後を比較し、シタグリプチン内服によるPAI-1の濃度変化の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 内蔵脂肪炎症モデルマウスにおける内蔵脂肪間質分画の細胞属性の解明

食事の糖・脂肪酸の組成は、諸臓器の糖脂質代謝に影響を及ぼす。2型糖尿病モデルマウスである膵細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損マウス(GK+/-)を用いて、食事の糖の主成分であるスクロース(S)と主要な脂肪酸であるオレイン酸(O)、リノール酸(L)をそれぞれ組み合わせた食餌(SO、SL)による多臓器の糖脂毒性の病態を解析した。また、DPP-4阻害薬des-fluoro-sitagliptin(DFS)の糖脂毒性存在下における膵島への作用および膵外作用について検討した。

SLを25週間投与したGK+/-マウスは、SO投与群に比較して、膵島における膵細胞量の低下と膵細胞の膵島内への分散化、膵細胞の小胞体ストレス誘導およびアポトーシス亢進が認められた。膵島におけるCHOP、BipのmRNA発現上昇も確認された。e-cadherin発現低下による膵島構造の障害も示唆された。野生型マウスでは、SLによる有意な変化は認められなかった。GK+/-マウスに、DFSを添加したSLを20週間投与したところ、OGTTにて耐糖能の改善を示すとともに、膵島における膵細胞量低下と膵細胞の分散化の改善、膵細胞における小胞体ストレス、アポトーシスの抑制、膵細胞の増殖能亢進が認められた。MIN6細胞を用いて、in vitroでもリノール

酸誘導性の小胞体ストレス誘導が認められ、GLP-1シグナルによる脂肪酸誘導性小胞体ストレスの修飾およびアポトーシス抑制が示された。

SL群では白色脂肪細胞サイズはSO群と同様であったが、脂肪組織へのマクロファージ浸潤亢進およびCD11c陽性M1マクロファージの増加を呈し、CD8陽性T細胞増加も認めた。DFS投与により脂肪組織へのM1マクロファージおよびCD8陽性T細胞浸潤が改善した。DFSによるCD8陽性T細胞に対する効果を検討中である。SO、SL両群において軽度の脂肪肝が認められたが、DFS投与により両群ともに脂肪蓄積が軽減した。mRNA発現解析では、SREBP-1cおよびSCD-1の発現抑制、PPARの発現上昇が認められた。

以上の成績より、スクロースとリノール酸とを組み合わせた食事による糖脂毒性モデルを確立することに成功し、DFSは膵島、脂肪組織および肝臓と、多臓器における食事誘導性の糖脂毒性に改善作用を持つことを証明した。膵島に対してはGLP-1を介した小胞体ストレスおよびアポトーシスからの保護、肝臓に対してはGLP-1を介した脂肪合成系酵素発現調節による肝臓内脂肪蓄積の抑制、脂肪組織に対してはDPP-4酵素活性阻害によるリンパ球・マクロファージの機能修飾の可能性が示唆された。

(2) 動物由来の内皮細胞、マクロファージ、T細胞および脂肪細胞株へのDPP-4およびインクレチンの作用解析

膵島とマクロファージの共培養により、膵島において炎症に關与するIL-1、TNF-、IL-6、CCL2、S100A8/A9のmRNA発現上昇が認められ、パルミチン酸の存在下ではS100A8/A9の発現はさらに上昇した。IL-6やCCL2の発現は継時的な上昇傾向を示したが、S100A8/A9は共培養12時間経過時点から急激な発現上昇を認めた。マクロファージにおいても、膵島との共培養によりIL-1、TNF-、IL-6、CCL2のmRNA上昇が認められ、パルミチン酸の添加によりこれらの発現はさらに上昇した。TLR4阻害ペプチドであるVIPERを添加すると、3者の共培養による膵島でのS100A8/A9の発現上昇は阻害され、IL-1、TNF-、IL-6、CCL2上昇も抑制傾向を示し、マクロファージでのIL-1、TNF-、IL-6、CCL2発現上昇も減少した。同様に膵島とマクロファージの共培養にLPSを添加するとIL-1、TNF-、IL-6、CCL2の発現上昇を認めた。マクロファージ非存在下では、膵島にパルミチン酸やLPSを添加しても、これらのmRNA発現上昇は認めなかった。

膵島とマクロファージの共培養条件下において、両者での炎症が惹起され、その炎症は脂肪組織より分泌される遊離脂肪酸により増強された。この結果から膵島、浸潤マクロファージ、脂肪組織の三者が、慢性炎症の

増強において相互作用している可能性が示唆され、これらの組織間でのネットワーク制御が新たな膵細胞に着目した糖尿病治療開発につながる事が期待された。

(3) インクレチンによる脂肪組織炎症抑制と他臓器との関連性

DPP-4 阻害薬により、脂肪炎症抑制効果以外に、グルコース応答性インスリン分泌能改善、体重増加抑制、脂肪肝の抑制効果が認められた。肝臓に対しては GLP-1 を介した脂肪合成系酵素発現調節による肝臓内脂肪蓄積の抑制の可能性が示唆された。

(4) DPP-4 欠損マウスを用いた内臓脂肪炎症抑制メカニズムの解析

この課題に関しては、他のテーマを優先して進めたこともあり、十分な成果を上げることはできなかった。

(5) DPP-4 阻害による内臓脂肪炎症抑制の臨床応用

DPP-4 阻害薬を内服していない2型糖尿病患者において、血清 PAI-1 濃度はアルブミン尿、BMI、血清中性脂肪値、LDL コレステロール値とは独立に、eGFR と負の相関をしていた。

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 11 件)

1. Shirakawa J, Okuyama T, Yoshida E, Shimizu M, Horigome Y, Tuno T, Hayasaka M, Abe S, Fuse M, Togashi Y, Terauchi Y. Effects of the antitumor drug OSI-906, a dual inhibitor of IGF-1 receptor and insulin receptor, on the glycemic control, β cell functions, and β cell proliferation in male mice. *Endocrinology*. 2014 Apr 8;en20132032. 査読有, [Epub ahead of print]
2. Togashi Y, Shirakawa J, Orime K, Kaji M, Sakamoto E, Tajima K, Inoue H, Nakamura A, Tochino Y, Goshima Y, Shimomura I, Terauchi Y. β cell proliferation after a partial pancreatectomy is independent of IRS-2 in mice. *Endocrinology*, 2014 Feb 11;en20131796. 査読有, [Epub ahead of print]
3. Tajima K, Nakamura A, Shirakawa J, Togashi Y, Orime K, Sato K, Inoue H, Kaji M, Sakamoto E, Ito Y, Aoki K, Nagashima Y, Atsumi T, Terauchi Y. Metformin prevents liver tumorigenesis induced by high-fat diet in C57Bl/6 Mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*;305(8): E987-98. 査読有, 2013 Oct 15.
4. Shirakawa J, Togashi Y, Sakamoto E, Kaji M, Tajima K, Orime K, Inoue H, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in

pancreatic β cells. *Diabetes*, 62(10): 3448-58, 査読有, 2013.

5. Kubota A, Maeda H, Kanamori A, Matoba K, Jin Y, Minagawa F, Obana M, Iemitsu K, Ito S, Amemiya H, Kaneshiro M, Takai M, Kaneshige H, Hoshino K, Ishikawa M, Minami N, Takuma T, Sasai N, Aoyagi S, Kawata T, Mokubo A, Takeda H, Honda S, Machimura H, Motomiya T, Waseda M, Naka Y, Tanaka Y, Terauchi Y, Matsuba I. Pleiotropic effects of sitagliptin in the treatment of type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Med Res*. 4(5):309-13, 査読有, 2012.

6. Nakamura A, Togashi Y, Orime K, Sato K, Shirakawa J, Ohsugi M, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small molecule glucokinase activator under various conditions. *Diabetologia*, 55(6):1745-54, 査読有, 2012.

7. Shirakawa J, Tanami R, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Goshima Y, Terauchi T. Effects of liraglutide on β cell-specific glucokinase-deficient neonatal mice. *Endocrinology*, 153(7): 3066-75, 査読有, 2012.

8. Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kikuchi K, Miyazaki T, Sato K, Kimura M, Goshima Y, Terauchi Y. Plasminogen activator inhibitor-1 is associated with renal dysfunction independent of BMI and serum lipid levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 97(1): e7-e10, 査読有, 2012.

9. Sato K, Nakamura A, Shirakawa J, Muraoka T, Togashi Y, Shinoda K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Impact of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin on glucose tolerance, beta cell function and mass in insulin receptor substrate-2-knockout mice fed a high-fat diet. *Endocrinology*, 153(3): 1093-102, 査読有, 2012.

10. Shirakawa J, Amo K, Ohminami H, Orime K, Togashi Y, Ito Y, Tajima K, Koganei M, Sasaki H, Takeda E, Terauchi Y. Protective effect of a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor against increased β cell apoptosis induced by dietary sucrose and linoleic acid in mice with diabetes. *J Biol Chem*, 286(29): 25467-76, 査読有, 2011.

11. Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E and Terauchi Y: Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*, 60: 1246-1257, 査読有, 2011.

[学会発表](計 13 件)

1. Inoue H, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y: Coordinated effects of macrophages and free fatty acids on the inflammatory gene

expression in pancreatic islets. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. September 23-27, 2013, Barcelona, Spain

2. Shirakawa J, Terauchi Y: Characterization of target genes of glucokinase activator (GKA) in pancreatic islets. 73rd American Diabetes Association (ADA) meeting, June 21-25, 2013, Chicago, USA.

3. 田島一樹、中村昭伸、白川純、折目和基、富樫優、井上英昭、長嶋洋治、寺内康夫: メトホルミンは高脂肪食下での肝腫瘍形成を抑制する。第 86 回日本内分泌学会学術総会, 仙台, 2013, 4, 25.

4. 寺内康夫: 2 型糖尿病に対するインクレチン療法: 基礎と臨床。第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013, 3, 29.

5. 寺内康夫: メタボリックシンドロームと炎症。第 47 回 糖尿病学の進歩, 津, 2013, 2, 15.

6. Terauchi Y: Postprandial Hyperglycemia and Vascular Disorder. The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, Tokushima, Japan, 2012, 12, 5.

7. Togashi Y, Shirakawa J, Nakamura A, Terauchi Y. Signaling pathway of β Cell proliferation in pancreatectomy is distinct from that in high-fat diet-loading in Mice. American Diabetes Association 72st Scientific Sessions. Philadelphia, USA, 2012, 6, 8.

8. Shirakawa J, Terauchi Y: Glucokinase Activator Ameliorates β cell ER Stress and Apoptosis by both IRS-2-dependent and -Independent Pathways. 72th American Diabetes Association (ADA) meeting, Philadelphia, USA, 2012, 6, 8.

9. Tajima K, Shirakawa J, Orime K, Togashi Y, Terauchi Y: Regulation of expression of incretin receptors in islet by dephosphorylation of AMPK. 72th American Diabetes Association (ADA) meeting, Philadelphia, USA, 2012, 6, 8.

10. 白川 純、田島一樹、富樫優、折目和基、寺内康夫: シンポジウム 2 型糖尿病 インスリン分泌 Insulin Secretion in Type 2 Diabetes Effects of glucokinase activator (GKA) on the regulation of cell ER stress and incretin receptor expressions. 第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会, 横浜, 2012, 5, 17.

11. 白川 純、寺内康夫: 膵 細胞特異的グルコキナーゼ欠損マウスにおけるリラグルチドの効果。第 26 回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 名古屋, 2012, 2, 17.

12. Orime K, Shirakawa J, Nakamura A, Togashi Y, Tajima K, Sato K, Terauchi Y: Trefoil factor 2 (TFF2) induces proliferation of pancreatic β cells. 71st Scientific Sessions for American Diabetes Association (ADA), San Diego, USA, 2011, 6, 24.

13. Sato K, Shirakawa J, Muraoka T, Togashi, Orime K, Nakamura A, Terauchi Y: Impact of

vildagliptin on glucose tolerance, and beta cell mass in insulin receptor substrate-2-knockout mice. 71st Scientific Sessions for American Diabetes Association (ADA), San Diego, USA, 2011, 6, 24.

〔図書〕(計 5 件)

1. 寺内康夫、伊藤裕、石橋俊編: Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2014. 中外医学社. P 213, 2014.

2. 寺内康夫、伊藤裕、石橋俊編: Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2013. 中外医学社. P 229, 2013.

3. 寺内康夫編: ここが知りたいインクレチン関連薬. 中外医学社, P 195, 2013.

4. 寺内康夫、伊藤裕、石橋俊編: Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012. 中外医学社. P 245, 2012.

5. 寺内康夫編: 2 型糖尿病の薬物療法ハンドブック. 南江堂, 2011 P 170.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 真理 (KIMURA, Mari)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号: 40363840

(2) 研究分担者

寺内 康夫 (TERAUCHI, Yasuo)
横浜市立大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 40359609

中村 昭伸 (NAKAMURA, Akinobu)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号： 70552420

(3)連携研究者
()

研究者番号：