

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500494

研究課題名(和文)新しいマクロファージ分子M-modによる2型糖尿病制御

研究課題名(英文)Modulatory effects of macrophage M-mod/USP2 on type2 diabetes

研究代表者

北村 浩(Kitamura, Hiroshi)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：80312403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージのM-mod(USP2A)の2型糖尿病発症における役割と作用機構を検証した。肥満マウスの脂肪組織マクロファージではM-mod2の発現が減少した。一方、マクロファージ選択的M-modトランスジェニックマウスを作成し、3カ月間の高脂肪給餌に供したところ、血液生化学的な変化は見られなかったが、脂肪組織マクロファージの炎症関連遺伝子の発現や脂肪組織への浸潤が抑えられた。さらに1年間後には体重の低下とインスリン感受性の改善がみられた。一方、マクロファージ選択的なM-mod KOマウスも作成した。培養細胞を用いた検討で、M-modは標的遺伝子周囲のヒストンメチル化やアセチル化に影響を与えた。

研究成果の概要(英文)：1) In ob/ob mice, M-mod/USP2A expression was clearly decreased in adipose tissue macrophages whereas aP2 and PAI were increased. Transgenic mice selectively expressing M-mod in macrophages did not exhibit significant changes in body weight gain, blood glucose levels, and blood insulin levels after high fat diet for 3 months. On the other hand, the M-mod transgenic mice displayed decreased accumulation of macrophages in visceral adipose tissues in parallel with decreased expression of chemokines in macrophages. In addition, M-mod overexpression in macrophages for 1 year caused decreased body weight gain and improved insulin sensitivity. Thus, M-mod seems to be a potent attenuator of type 2 diabetes.

2) M-mod knockdown macrophage-like cells modulated acetylation and methylation of histone near the M-mod-targeting genes such as aP2. Moreover, we found several nuclear proteins directly associated with M-mod in macrophages.

研究分野：実験動物学

キーワード：マクロファージ 糖尿病 炎症 トランスジェニックマウス ノックアウトマウス 脂肪組織 遺伝子  
発現 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 国際糖尿病連合による 2014 年の統計では糖尿病患者は全世界で 3 億人以上とされており、その大多数は 2 型糖尿病患者である。わが国でも厚労省の「2013 年国民健康・栄養調査」によれば男性の 16.2%、女性の 9.2%が糖尿病有病者であり、その 9 割以上が 2 型糖尿病とされる。従って 2 型糖尿病の克服は医学領域における最大の関心事の一つとなっている。2 型糖尿病の原因はインスリン分泌細胞である膵臓ランゲルハンス島の細胞の機能不全と、肝臓や骨格筋といったエネルギー代謝臓器におけるインスリン感受性の低下であることが知られている。しかし近年、これら異なる 2 種類の不全に対し、内臓脂肪組織における炎症反応が共通のトリガーとなることが明らかにされた。特に脂肪組織のマクロファージは脂肪組織間質最大の細胞集団であり、脂肪組織炎症を惹起する主要なエフェクター細胞であることが分かっており、この細胞を選択的に制御する分子機構の解明が待たれる。

(2) 研究者のグループはこれまでに、ヒト骨髄性白血病由来細胞株である HL-60 をホルボールエステルでマクロファージ様に分化させ、発現変動する遺伝子を網羅的手法で探索してきた。その結果見出した M-mod [または USP(ubiquitin specific peptidase) 2 の 69kDa のバリエーション USP2A] は分化に伴い発現が低下した。この遺伝子をショートヘアピン RNA でノックダウンした細胞(M-mod KD 細胞)では、aP2 や PAI-1 といった 2 型糖尿病の進行に関わる遺伝子の発現が選択的に高まった。このことは、マクロファージで発現する M-mod は、2 型糖尿病の進行を抑える新たな抗糖尿病分子であることが示唆された。しかしながらこれらの知見はあくまで細胞株を用いた検証に限定されており、実際に個体レベルで M-mod が糖尿病を制御するのは推測の域を出ない。一方で M-mod による遺伝子発現抑制メカニズムについても依然ブラックボックスである。M-mod はユビキチン鎖を選択的に消化するイソペプチダーゼである。これまでに Mdm2 や Ripk1 といった M-mod により直接脱ユビキチン化される標的タンパク質が報告されているが、糖尿病関連遺伝子の発現抑制に関わる直接・間接的な M-mod の標的分子は未知のみである。

## 2. 研究の目的

(1) これまでの研究成果より培養細胞系で M-mod が糖尿病の悪化に関わる遺伝子の発現を選択的に抑制することを見出した。しかしながらこの知見は一細胞株を用いた検討結果に限定されており、個体において M-mod が抗糖尿病効果を有するののかの情報は無い。そこで M-mod 遺伝子の発現をマクロファージ選択的に変化させた組換えマウスを用い

て、マクロファージの M-mod の発現の多少がマウス個体レベルでの糖尿病の進行や症状に与える効果を明らかにすることを目的とした。また、肥満モデル動物における脂肪組織マクロファージの M-mod の発現を明らかにすることで肥満症における M-mod の関与の傍証を得ることも目的とした。

(2) これまでの M-mod KD 細胞を用いた検討で、NF- $\kappa$ B などの転写因子や MAP キナーゼなどのタンパク質キナーゼの量や活性に変化はなかった。しかし M-mod がユビキチンイソペプチダーゼ活性依存的に標的遺伝子座の H3 ヒストンのメチル化を変化させるというデータを得た。そこで、M-mod により制御を受ける核内イベントをより詳細に解明することも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物・使用細胞

C57BL/6HamSlc-ob/ob マウス及びその野生型コントロールマウスはオス 12 週齢を使用した。

M-mod トランスジェニックマウス：C57BL/6N マウス (SLC) の受精卵に *fms intronic regulatory element (FIRE)* 制御下で M-mod を強制発現するトランスジーンを導入して樹立した。このマウスはマクロファージ選択的に M-mod が強制発現される。このマウスと野生型マウスに 60%kcal の高脂肪食 (Research Diet) を給餌した。

M-mod コンディショナルノックアウト (CKO) マウス：M-mod の 2 番目と 3 番目のエクソンの 5' 側と 3' 側に loxP 配列を導入した組換え遺伝子エレメントを C57BL/6 由来の ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。G418 (Gibco) で選択後、細胞からゲノムを抽出し、PCR 法にて正しい向きに相同組換えが生じている ES 細胞クローンを選択した。次に、選択した組換え ES 細胞をマイクロマニピュレーターで胚盤胞期胚に注入し、仮親の Balb/c マウスに移植した。得られた産子のうち、挿入した ES 細胞の寄与率の高いキメラマウスを選抜した。キメラマウス以後の作業は研究成果の項に示す。

### (2) 血液生化学試験

血糖値はフリースタイルライト (アボットジャパン) で測定した。また、中性脂肪量、遊離脂肪酸量、総コレステロール量はテストワコーキット (和光純薬) で測定した。インスリン抵抗性試験、グルコース負荷試験は日本糖尿病・肥満動物学会のプロトコールに従った。

### (3) 脂肪組織血管間質画分の調製

マウスの生殖器周囲または腸管膜脂肪組織を採材し、コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) を 37、20 分間処理し、残存赤血球を ACK 溶液で溶血させ、遠心後得た。

#### (4) FACS 解析とマクロファージのソーティング

脂肪組織の血管間質画分を、5%ウシ胎児血清を含む PBS 溶液で懸濁後、PE 標識抗 F4/80 抗体と Alexafluor488 標識 CD11b 抗体で染色し、FACS Cantoll (BD Bioscience) で解析した。一方、F4/80<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>マクロファージは FACS Arial1 でソーティングした。

#### (5) 定量的逆転写 PCR 解析

TRIzol 溶液 (Life Technologies) を用いて全 RNA を抽出した。これら全 RNA を鋳型に M-MLV 逆転写酵素 (Life Technologies) で逆転写し、得られた cDNA と KAPA SYBR fast キットを用いて qPCR 解析を実施した。内部標準として HPRT-1 の発現を調べた。また一部の微量サンプルについては Ovation qPCR amplification kit (Nugen) で cDNA を増幅後、PCR 反応に供した。

#### (6) 免疫組織学的解析

ホルマリン固定液 (ナカライ) で固定した脂肪組織のパラフィン切片は抗ガレクチン 3 抗体 (Santa Cruz) を一次抗体として処置後、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ IgG 抗体を反応させた。その後、Histofine キットで発色させ、免疫シグナルを検出した。核はヘマトキシリンで染色した。

#### (7) ウェスタンブロット解析

核抽出キット (Active Motif) で調製した核タンパク質を SDS-PAGE に供した後に、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。転写後ブロッキングワシ (ナカライ) でブロッキングを行い、その後修飾化ヒストンやヒストン修飾酵素に対する抗体 (Santa Cruz, Cell Signaling Technology, Abcam) で反応後、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体で反応させた。免疫シグナルの検出は化学発光キット (ナカライ) 及びバイオイメージャー (LAS-1000、フジフィルム) を用いた。

#### (8) 免疫沈降解析とクロマチンアクセシビリティ試験

M-mod の免疫沈降実験は予め HA タグを付加した M-mod を強制発現させた 293 細胞 (Life Technologies) から調製した核タンパク質に対し HA-IP/CoIP キット (Pierce) で沈降させ、ウェスタンブロットまたは銀染色解析に供した。クロマチン免疫沈降解析は SimpleChIP キット (Cell Signaling Technology) と修飾化ヒストン抗体 (Cell Signaling Technology, Abcam, Millipore より入手) を用いて実施した。クロマチンアクセシビリティ解析は EpiQ クロマチン解析キット (BioRad) を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 遺伝性肥満マウスを用いた M-mod の発現解析

遺伝性肥満モデルマウス (ob/ob マウス) と野生型コントロールマウスを比較したところ、生殖器周囲の脂肪重量、血糖値や血中脂質量、空腹時のインスリンレベルに増加がみられ、脂肪組織 F4/80<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>マクロファージの aP2 及び PAI-1、TNF $\alpha$  の発現の増加がみられた。一方で、M-mod の発現は有意に減少していた (図 1)。M-mod の 45kDa の短いスプライシング変異体の発現には影響がみられなかった。培養マクロファージにおいて M-mod が aP2 や PAI-1 の発現を有意に抑えることを考え併せると、M-mod の発現低下が肥満検体の脂肪組織マクロファージの発現制御に関与している可能性が示唆された。

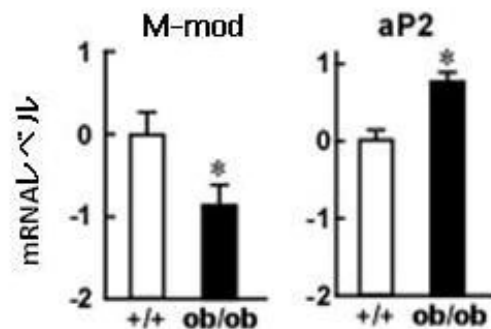


図 1 ob/ob マウス及びコントロール+/+マウスの脂肪組織内マクロファージにおける M-mod の発現

(2) マクロファージ選択的 M-mod トランスジェニックマウスの短期高脂肪給餌後の表現型解析

次に、FIRE プロモーター制御下で、マクロファージ選択的に M-mod を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて表現型解析を実施した。高脂肪餌を 14 週間与えたところ、トランスジェニックマウスとコントロールマウスで摂餌量、体重共に有意な差がみられなかった。また空腹時の血中インスリンレベ

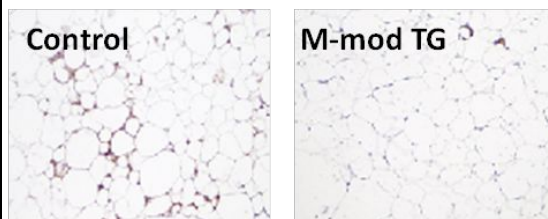


図 2 腸管膜脂肪組織のマクロファージの染色 (紫)

ル血糖値、随時血糖値、血中脂質 (中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール量) にも有意な差がみられなかった。しかし FACS 解析の結果、腸管膜脂肪組織中の F4/80<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>マクロファージ数が僅かに減少していた。この現象は腸管膜脂肪組織をマクロファージマーカーであるガレクチン 3 に対する抗体で染色した免疫組織化学的解析においても顕著に認められた (図 2)。一方で、FACS 解析で CD11c<sup>+</sup>M1 マクロファージと CD206<sup>+</sup>M2 マクロファージの比を調べたところ有意な差は認

められなかった。次に、脂肪組織から F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>マクロファージを分離し、qRT-PCR 法で遺伝子発現解析を行ったところ、コントロールマウスと比べ M-mod トランスジェニックマウスのマクロファージでは、aP2 や PAI-1, CXCL7 の発現低下が認められた。以上の結果より、M-mod トランスジェニックマウスは腸管膜脂肪組織の代謝性炎症反応を軽減することが明らかになった。

### (3) マクロファージ選択的 M-mod トランスジェニックマウスの長期高脂肪給餌後の表現型解析

高脂肪餌の給餌期間を延長し、エネルギー代謝能の変化を追跡した。50 週間飼育したところ、摂餌量は有意な差がみられなかったが ( $P=0.771$ )、僅かな体重増加がみられた ( $P<0.05$ )。このとき、血糖値は自由給餌時、絶食時ともコントロールマウスと M-mod トランスジェニックマウスの間で差は見られなかった。一方、血中インスリンレベルは自由給餌時には変化が見られなかったが、絶食時は僅かに減少する傾向がみられた。このときインスリン負荷試験を実施したところ、コントロールと比べトランスジェニックマウスではインスリン投与後の血糖値の下がりが見られなかった ( $P<0.05$ )。以上の結果より、肥満状態が継続することでみられるインスリン耐性をマクロファージの M-mod は抑制することが明らかになった。

### (4) マクロファージ選択的 M-mod CKO マウスの作製

M-mod 遺伝子に loxP 配列を導入したターゲティングコンストラクトで相同組換えを行った ES 細胞を 3 クローン得た。このうち 1 クローンを胚盤胞に導入し、キメラマウス得た。しかしながら得られたキメラマウスは ES 細胞由来部分のキメラ率が低く、交配しても組換え遺伝子を生殖系列にもったマウスが中々得られなかった。そこでキメラ作出のスケールアップを図り、キメラ率の高い KT-18-70 キメラマウス (図 3) を得た。

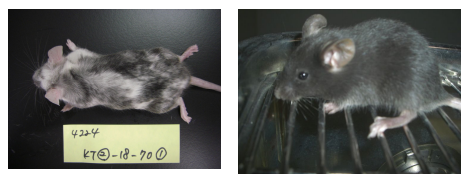


図 3 M-mod キメラマウス(左)とヘテロマウス(右)

次にこのキメラマウスを基に M-mod fl/+マウスの作製を試みた。こちら中々組換え遺伝子が生殖系列で見出せなかったが、最終的に M-mod fl/+マウスが複数ライン得られ、これを基に M-mod fl/fl マウスを得た。さらに M-mod fl/fl マウスと LyzM-Cre マウスを交配して得られたヘテロマウスを交配し、最終的に M-mod fl/fl, LyzM-Cre M-mod CKO マウス

を得た。

### (5) マクロファージ選択的 M-mod CKO マウスの表現型解析

M-mod CKO マウスに高脂肪餌を 2 カ月給餌し、同腹コントロールマウス (M-mod fl/fl, Cre(-)) と血糖値を測定したところ、自由給餌時、絶食時とも差は見出せなかった。また、インスリン負荷試験を実施しても有意な差は見られなかった。2 カ月の給餌期間では差を生ずるに不十分だったのかもしれない。

### (6) M-mod による核内遺伝子発現制御機構の解明

ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 を基に作製した M-mod KD 細胞とコントロール細胞の核タンパク質を抽出し H4 ヒストンのアセチル化や H3 ヒストンのメチル化、H2 ヒストンのユビキチン化をウエスタンブロット法で解析したが、いずれも差は見出せなかった。しかしながら、aP2 遺伝子座についてクロマチン免疫沈降解析を実施したところ、H4 ヒストンの 5、8、12 番目のリジンのアセチル化の亢進がみられた。また、これまでに見出した aP2 遺伝子座のリジンのメチル化が 4 番目のリジンによるものであることが判明した。一方 aP2 遺伝子座だけに絞ってもヒストンのユビキチン化、リン酸化は M-mod のノックダウンの効果は見出せなかった。

M-mod KD 細胞の aP2 遺伝子座で見出されたヒストンの変化が遺伝子座のアクセシビリティに変化をもたらすかを調べたところ、有意にアクセシビリティの亢進が認められた (図 4)。またこの変化は M-mod KD 細胞へ M-mod 強制発現コンストラクトを再導入することで解除されたが、ユビキチンイソペプチダーゼ欠損変異体を導入した場合解除されなかった。従って、M-mod はユビキチンイソペプチダーゼ活性依存的に標的遺伝子のアクセシビリティを抑えていることが判明した。

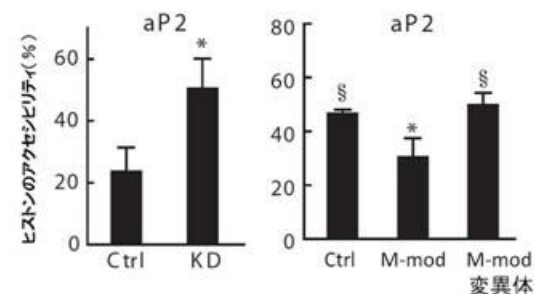


図 4 aP2 遺伝子座のアクセシビリティ。左図はコントロール (Ctrl) 細胞と M-mod KD 細胞の比較、右図は M-mod KD 細胞に空ベクター (Ctrl), M-mod 強制発現ベクター、ユビキチンイソペプチダーゼ変異体発現ベクターを導入した細胞のデータを示す。\* $P<0.05$  vs コントロール細胞、§ $P<0.05$  vs M-mod 導入細胞

M-mod によるヒストン修飾に関わるタンパク質を探索することを目的に、M-mod 強制発現細胞から調製した核抽出物を材料に M-mod を免疫沈降し、共沈降してきたタンパク質を電気泳動した。ウエスタンブロット解析によりアセチル化修飾酵素(p300 及び HDAC 各種)を検出したが、検出できなかった。従ってこれら酵素を直接制御していないと考えられる。一方、共免疫沈降タンパク質の電気泳動ゲルを銀染色すると再現性よくタンパク質バンドが検出された。これらの M-mod 結合タンパク質の同定と遺伝子発現における役割、M-mod による制御の有無の評価が今後の課題である。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H, Iwanaga T, Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches, *Mucosal Immunology*, 査読有、8, 2015, 650-660  
DOI:10.1038/mi.2014.99

Taguchi K, Okada A, Kitamura H, Yasui T, Naiki T, Hamamoto S, Ando R, Mizuno K, Kawai N, Tozawa K, Asano, Tanaka M, Miyoshi I, Kohri K, Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. *Journal of American Society of Nephrology*, 査読有、25, 2014, 1680-1697  
DOI: 10.1681/ASN.2013060675

Kitamura H, Kimura S, Shimamoto Y, Okabe J, Ito M, Miyamoto T, Naoe Y, Kikuguchi C, Meek B, Toda C, Okamoto S, Kanehira K, Hase K, Watarai H, Ishizuka M, El-Osta A, Ohara O, Miyoshi I, Ubiquitin-specific protease 2-69 in macrophages potentially modulates metainflammation, *FASEB Journal*, 査読有、27, 2013, 4940-4953  
DOI: 10.1096/fj.13-233528

Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Miyamoto T, Okamoto S, Toda C, Shimamoto Y, Iwanaga T, Miyoshi I, Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice –Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue-, *Adipocyte*, 査読有、2, 2013, 227-236  
DOI: 10.4161/adip.25608

#### 〔学会発表〕(計7件)

Kitamura H, Roles of a macrophage molecule M-mod in type 2 diabetes, *Experimental Biology 2012*, 2012年4月21日-25日、サンディエゴ(米国)

Kitamura H, Possible involvement of a novel macrophage molecule in pathogenesis of type 2 diabetes, *The 4<sup>th</sup> EMBO meeting*, 2012年9月22日-25日、ニース(フランス)

Kitamura H, A macrophage modulator has potential to repress metabolic deterioration, *IEIIS2012*, 2012年10月23日-26日、学術総合センター(東京都)

北村 浩、マクロファージ分子 M-mod による肥満症・糖尿病の制御、日本獣医学会、2013年9月21日、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)

北村 浩、マクロファージの USP2 による2型糖尿病制御の可能性、日本実験動物学会、2014年5月15日、札幌コンベンショナルセンター(北海道、札幌市)

北村 浩、マクロファージの USP2-新たな糖尿病制御分子-、日本獣医学会・日本実験動物医学会、2014年9月10日、北海道大学(北海道・札幌市)

北村 浩、ブラジル産プロポリスの糖尿病予防効果-脂肪組織中の免疫細胞をターゲットとした予防メカニズムの検証-、日本農芸化学学会、2015年3月29日、岡山大学(岡山県・岡山市)

#### 〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://rgufd.rakuno.ac.jp/profile/ja.VZR1f1TTIFAxq0uj6Qj-Dw==.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北村 浩(KITAMURA, Hiroshi)  
酪農学園大学・獣医学群獣医学類・教授  
研究者番号: 80312403

##### (2) 連携研究者

三好 一郎(MIYOSHI, Ichiro)  
東北大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10183972

岡本 士毅 (OKAMOTO, Shiki)  
自然科学研究機構・生理学研究所・助教  
研究者番号：40342919

直江 吉則 (NAOE, Yoshinori)  
国立長寿医療研究センター研究所・研究員  
研究者番号：50392048

高橋 英機 (TAKAHASI, Eiki)  
理化学研究所・脳科学総合研究センター・  
ユニットリーダー  
研究者番号：40446521

岩永 敏彦 (IWANAGA, Toshihiko)  
北海道大学大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10160128

木村 俊介 (KIMURA, Shunsuke)  
北海道大学大学院医学研究科・助教  
研究者番号：40444525