

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24591515

研究課題名(和文) 小児期のホルモンと免疫系細胞・脂肪細胞の分化増殖ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analysis of growth and differentiation network system for immune cells of adipocyte by hormone during childhood

研究代表者

井原 健二 (Ihara, Kenji)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80294932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：単球系細胞の活性化を介した成長ホルモンの脂肪細胞の分化増殖作用を明らかにするための研究を行った。RAW264細胞を成長ホルモンで前処理することにより、Adipocyteと分離共培養した場合のAdiponectin産生量の低下の程度が減少した。これはGH刺激後にMacrophageが産生する液性因子が、脂肪細胞のAdiponectin発現量に影響を及ぼしたと推定された。次にGH処理により変化するRAW264細胞産生因子をメタボローム解析し、TCA回路で利用されるアミノ酸代謝産物(グルタミンとグルタミン酸など)の代謝変化の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied growth hormone (GH) for the differentiation and proliferation of adipocytes via activation of monocytes. Pretreatment with GH, RAW 264 cells decreased the degree of reduction of adiponectin production when co-cultured with adipocytes. It was presumed that some humoral factors produced by macrophage with GH stimulation had influenced on adiponectin expression from adipocytes. Next, metabolome analysis of the produced factors from RAW 264 cell with or without GH treatment suggested the significant changes in amino acid metabolites (such as glutamine and glutamic acid) in the TCA cycle.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：成長ホルモン 脂肪細胞 免疫細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は特に内臓脂肪型肥満を介して、脂質代謝異常のみならず糖質代謝異常や高血圧などのリスクが集積するメタボリックシンドロームの基盤病態である。成人のみならず小児においても年々増加傾向を示している事からも、社会的に大きな問題となっている。

医学的に肥満は体脂肪が過剰に蓄積した状態と定義され、細胞レベルでは成熟脂肪細胞の肥大化(サイズの増大)と脂肪細胞数の増加により決定される。そして脂肪組織には成熟脂肪細胞のみならず、前駆脂肪細胞、血管構成細胞、マクロファージなどの非成熟脂肪細胞分画が含まれており、肥満や痩せにより脂肪組織を構成する細胞割合が大きく変化する。最近では、肥満の脂肪組織にはマクロファージの浸潤が増加することが報告されており、脂肪組織における炎症性変化を増大し、これによりアディポサイトカイン産生調節の破綻につながる可能性が推定されている。

小児のメタボリックシンドロームは、成人のメタボリックシンドロームと比較し、次の2点で大きく異なる。第1点は、小児は身体的な成長発達の上であり、脂肪組織や糖質代謝も発達の過程にある。脂肪細胞も成長とともに増殖と分化の過程にあり多くの成長に関連ホルモン(主には成長ホルモンと性ホルモン)が成長とともに大きく変化する時期である。第2点は、小児期は免疫系についても発達途上にある。多くの種類の抗原刺激により免疫担当細胞が免疫能を獲得する過程にあり、免疫系が完成された成人とは大きく異なる免疫状態である。

われわれは、成長ホルモン治療による脂質代謝に与える影響についてこれまで長く研究を行っており、成長ホルモン受容体遺伝子ならびにその下流の STAT5B 遺伝子多型が脂質代謝に影響を及ぼすことを明らかにしてきた(Ihara et al, Clin Endocrinol 2007; Makimura, Ihara et al, Clin Endocrinol 2011)。また、胎児期のさまざまな原因で起こる低出生体重児(SGA児)は、成人期になりメタボリックシンドロームを発症するリスクが高いことから、胎児期のストレスがその原因として潜在することが知られており、SGA に対する成長ホルモン治療中の免疫系の変化も重要な臨床テーマである。

## 2. 研究の目的

脂肪細胞の分化増殖に影響を与えると推定される免疫系細胞について、脂肪組織の代謝に影響を与えるマクロファージ/単球の分化や成熟に影響を与えるホルモンを、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いた実験系を用いて検討する。

以下、段階的に目的を記す。

A) 「各種ホルモンがマクロファージ(単球)

を刺激することにより、脂肪細胞の増殖と炎症性アディポサイトカインの産生にどのような影響をあたえるか」という命題に対して、単球系と脂肪細胞系の2系統の培養細胞を、接触または非接触状態において共培養しサイトカイン・ケモカイン・アディポサイトカインの産生にどのような影響を及ぼすかを2段階に分けて検討する。

(Step 1) 小児期の発達発育を規定するホルモン(成長ホルモン) マクロファージ(単球)の分化や成熟への作用

(Step 2) ホルモンで刺激を受けたマクロファージ(単球) 脂肪細胞の増殖や炎症性アディポサイトカインの産生への作用

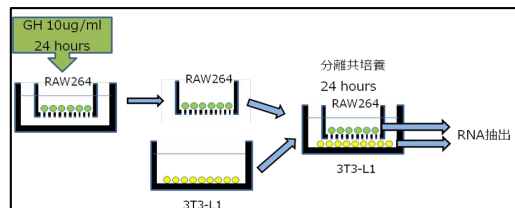
上記の各ステップについて、経時的に培養上清中に分泌されるサイトカイン・ケモカイン・アディポサイトカインを ELISA 法で測定し、各種ホルモン刺激に特徴的な液性因子の分泌を明らかにする。

B) さらに詳細に検討を行うために、マクロファージ系培養細胞を GH で刺激し、発培培養上清中に分泌されるについて網羅的に評価する。

## 3. 研究の方法

実験 1 :

脂肪細胞株 3T3-L1 細胞とマクロファージ系細胞株 RAW264 細胞を Trans-well dish を用いた分離共培養システムを構築した。共培養後にそれぞれの細胞から RNA を抽出しさまざまな遺伝子発現の変化を検討するとともに培養液中のサイトカイン・アディポサイトカインを ELISA 法により測定した(下図)。



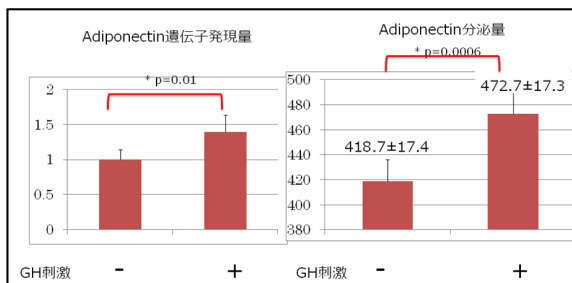
実験 2 :

マクロファージ系細胞株(RAW264)に GH を添加し、RAW264 から分泌される物質の経時的な変化をメタボローム解析によりスクリーニングした。特異的な GH 刺激により特異的に変化する因子群について、細胞の mRNA 発現量を測定した。メタボローム解析(Human Metabolome Technologies 社に委託解析)では、CE-TOFMS 法によりピークを検出し、アノテーションリストの約 900 種類の代謝物質(アミノ酸、ヌクレオシド、リン酸化有機酸、有機酸、を一斉解析した。上記の GH 添加、GH 無添加のコンディションにおいて、0, 12, 24 時間の各細胞群について検討を行い、これらの結果を用いたパスウェイマッピング、PCA、ヒートマップを作成した。

## 4. 研究成果

実験 1 :

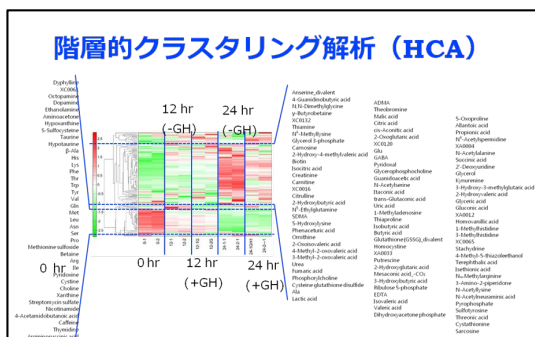
脂肪細胞株とマクロファージ細胞株の共培養により IL-6, TNF- $\alpha$  上昇、Adiponectin の低下を認めたと、GH で前処理した Macrophage と共培養した場合、Adiponectin の相対的産生量が上昇した ( 下図 )。



このことから、免疫系細胞による液性因子が、Adipocyte からの Adiponectin 発現量に影響を及ぼすことが推定された。

実験 2 :

次にメタボローム解析の結果を下に示す。メタボローム解析で見いだされた変化の中で、特に TCA 回路で利用される代謝産物に差が見いだされた。



今後、グルタミンとグルタミン酸の代謝変化を中心に、再現性を確認する実験を続ける必要がある。

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 30 件 )

1. Toda N, Ihara K, Kojima-Ishii K, Ochiai M, Ohkubo K, Kawamoto Y Kohno Y, Kumasaka S, Kawase A, Ueno Y, Futatani T, Miyazawa T, Nagaoki Y, Nakata S, Misaki M, Arai H, Kawai M, Sato M, Yada Y, Takahashi N., Komatsu A, Maki K, Watabe S, Sumida Y, Kuwashima M, Mizumoto H, Sato K, Hara T: Hyperinsulinemic hypoglycemia in Beckwith-Wiedemann, Sotos and Kabuki syndromes: A nationwide survey in Japan. Am J Med Genet 173(2):360-367, 2017, doi: 10.1002/ajmg.a.38011. ( 査読有 )

2. Ihara K, Fukano, Ayabe T, Fukami M, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Kikuchi N, Yokota I, Takemoto K, Mukai T, Nishii A, Kikuchi T, Mori T, Shimura N, Sasaki G, Kizu R, Takubo N, Soneda S, Fujisawa T, Takaya R, Kizaki Z, Kanzaki S, Hanaki K, Matsuura N, Kasahara Y, Kosaka K, Takahashi T, Minamitani K, Matsuo S, Mochizuki H, Kobayashi K, Koike A, Horikawa R, Teno S, Tsubouchi K, Mochizuki T, Igarashi Y, Amemiya S, Sugihara S, Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): FUT2 Nonsecretor Status Links Type 1 Diabetes Susceptibility in Japanese children. Diabet Med. 34(4):586-589, 2017, doi: 10.1111/dme.13288. ( 査読有 )

3. Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Nakacho M, Morioka I, Tsukahara H, Kaji S, Hirayama S, Miida T, Kondou H, Ihara K, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kodama T, Iijima K, Saheki T, Yorifuji T, Honda A: Circulating tricarboxylic acid cycle metabolite levels in citrin-deficient children with metabolic adaptation, with and without sodium pyruvate treatment. Mol Genet Metab. 120:207-212, 2017, doi: 10.1016/j.ymgme.2016.12.011. ( 査読有 )

4. Korematsu S, Yamada H, Miyahara H, Ihara K: Increased levels of anti-phosphatidylcholine and anti-phosphatidylethanolamine antibodies in pediatric patients with cerebral infarction. Brain Dev. 39(6):542-546, 2017 doi: 10.1016/j.braindev.2017.01.010. ( 査読有 )

5. Abe Y, Matsuduka A, Okanari K, Miyahara H, Kato M, Miyatake S, Saito H, Matsumoto N, Tomoki M, Ihara K: A severe pulmonary complication in a patient with COL4A1-related disorder: A case report. Eur J Med Genet. 60(3):169-171, 2017, doi: 10.1016/j.ejmg.2016.12.008. ( 査読有 )

6. Toda N, Hoshina T, Koga Y, Ochiai M, Kaku N, Yamamura K, Torisu H, Ihara K, Takada H, Maehara Y, Hara T: Analysis of the death due to infectious diseases in the patients hospitalized in the pediatric ward of a single

- Japanese tertiary medical facility. *Jpn J Infect Dis.* 69(6):464-470, 2016. (査読有)
7. Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, Toyoshima K, Tanaka Y, Fukuzawa R, Miyako K, Kinjo S, Ohga S, Ihara K, Inoue H, Kinjo T, Hara T, Kohno M, Yamada S, Urano H, Kitagawa Y, Tsugawa K, Higa A, Miyawaki M, Okutani T, Kizaki Z, Hamada H, Kihara M, Shiga K, Yamaguchi T, Kenmochi M, Kitajima H, Fukami M, Shimizu A, Kudoh J, Shibata S, Okano H, Miyake N, Matsumoto N, Hasegawa T: SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet.* 48(7):792-7, 2016, doi: 10.1038/ng.3569. (査読有)
  8. Ishii T, Fukuzawa R, Sato T, Muroya K, Adachi M, Ihara K, Igaki J, Hasegawa Y, Sato S, Mitsui T, Hasegawa T: Gonadal macrophage infiltration in congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 175(2):127-32, 2016, doi: 10.1530/EJE-16-0194. (査読有)
  9. Maeda T, Inoue M, Sekiguchi K, Ihara K: Aminophylline-associated irritable behaviour in preterm neonates. *Early Hum Dev.* 99:37-41, 2016, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2016.04.011. (査読有)
  10. Ayabe T, Fukami M, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Kikuchi N, Yokota I, Ihara K, Takemoto K, Mukai T, Nishii A, Kikuchi T, Mori T, Shimura N, Sasaki G, Kizu R, Takubo N, Soneda S, Fujisawa T, Takaya R, Kizaki Z, Kanzaki S, Hanaki K, Matsuura N, Kasahara Y, Kosaka K, Takahashi T, Minamitani K, Matsuo S, Mochizuki H, Kobayashi K, Koike A, Horikawa R, Teno S, Tsubouchi K, Mochizuki T, Igarashi Y, Amemiya S, Sugihara S, Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Variants associated with autoimmune Type 1 diabetes in Japanese children: implications for age-specific effects of cis-regulatory haplotypes at 17q12-q21. *Diabet Med.* 33(12):1717-1722, 2016, doi: 10.1111/dme.13175. (査読有)
  11. Kuga S, Goto H, Okanari K, Maeda T, Ihara K: Reversible cerebral vasoconstriction syndrome manifesting as focal seizures without a thunderclap headache: A pediatric case report. *Brain Dev.* 38(9):880-3, 2016, doi: 10.1016/j.braindev.2016.04.006. (査読有)
  12. Ochiai M, Matsushita Y, Inoue H, Kusuda T, Kang D, Ichihara K, Nakashima N, Ihara K, Ohga S, Hara T; Kyushu University High-Risk Neonatal Clinical Research Network, Japan. Blood Reference Intervals for Preterm Low-Birth-Weight Infants: A Multicenter Cohort Study in Japan. *PLoS One* 11(8): e0161439, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0161439. (査読有)
  13. Kanno S, Nishio H, Tanaka T, Motomura Y, Murata K, Ihara K, Onimaru M, Yamasaki S, Kono H, Sueishi K, Hara T: Activation of an Innate Immune Receptor, Nod1, Accelerates Atherogenesis in Apoe<sup>-/-</sup> Mice. *J Immunol* 194(2):773-80, 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1302841. (査読有)
  14. Ohkubo K, Sakai Y, Inoue H, Akamine S, Ishizaki Y, Matsushita Y, Sanefuji M, Torisu H, Ihara K, Sardiello M, Hara T: Moyamoya disease susceptibility gene RNF213 links inflammatory and angiogenic signals in endothelial cells. *Sci Rep* 5:13191, 2015, doi: 10.1038/srep13191. (査読有)
  15. Hirano M, Satake W, Ihara K, Tsug I, Kondo S, Saida K, Betsui H, Okubo K, Sakamoto H, Ueno S, Ikuno Y, Ishihara R, Iwahashi H, Ohishi M, Mano T, Yamashita T, Suzuki Y, Nakamura Y, Kusunoki S, Toda T: The first nationwide survey and genetic analyses of Bardet-Biedl syndrome in Japan. *PLOS ONE* 10(9):e0136317, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0136317. (査読有)
- [学会発表](計 5 件)
1. Kojima-Ishii K, Toda N, Ohkubo K, Hara T, Ihara K: Hyperinsulinemic hypoglycemia in Beckwith-Wiedemann syndrome, Sotos syndrome and Kabuki syndrome: a nationwide survey in Japan. The 11th Congress of Asian Society for

Pediatric Research, April 15-17, 2015,  
Osaka International Convention Center,  
Osaka City, Osaka, Japan

2. 井原健二：脂質代謝と成長ホルモン：免疫細胞を介した調節メカニズムの探究．第 21 回宮崎代謝内分泌研究会 2015.3.20、宮崎大学医学部（宮崎県・宮崎市）
3. 石井加奈子、井原健二、大久保一宏、松尾光通、戸田尚子、原 寿郎：SGA 性低身長に対する GH 治療による代謝・免疫学的影響の検討．第 87 回日本内分泌学会 2014.4.24-26、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
4. 井原健二、原寿郎、大賀正一、竹本稔、横手幸太郎：早老症 Hutchinson-Gilford 症候群の全国疫学調査：診療ガイドライン策定に向けて．第 48 回日本小児内分泌学会 2014.9.25-27、アクトシティ浜松（静岡県・浜松市）
5. 戸田尚子、井原健二、石井加奈子、大久保一宏、原 寿郎：奇形症候群（Beckwith-Wiedemann 症候群、Sotos 症候群、Kabuki 症候群）における高インスリン血性低血糖症の全国調査報告．第 48 回日本小児内分泌学会 2014.9.25-27、アクトシティ浜松（静岡県・浜松市）

〔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〕なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 井原 健二 (Ihara, Kenji)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80294932

(2)研究分担者 石井 加奈子 (Ishii,

Kanako) 九州大学・大学病院・講師

研究者番号：90400332