

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：24790918

研究課題名(和文)マクロファージの酸素センシング機構の糖尿病発症における役割

研究課題名(英文)HIF-1 alpha, a hypoxia inducible transcription factor, in macrophage promotes onset of insulin resistance and diabetes

研究代表者

仙田 聡子 (SENDA, Satoko)

富山大学・大学病院・短時間勤務医師

研究者番号：40597770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満時の腹腔内脂肪組織の慢性炎症は糖尿病・インスリン抵抗性との関連が強く、炎症の中心となるのは脂肪組織マクロファージである。低酸素はインスリン抵抗性の機序の1つであり、本研究ではマクロファージに発現する低酸素誘導因子HIF-1 についてインスリン抵抗性との関連を検討した。マクロファージのHIF-1 を欠損したマウスでは、肥満時の脂肪組織における炎症の軽減、血管新生の促進、低酸素の軽減を認め、全身のインスリン抵抗性が改善した。本研究結果から、マクロファージに発現するHIF-1 の抑制がインスリン抵抗性の改善、糖尿病発症予防につながるということが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is a pathophysiology of insulin resistance in obesity. Adipose tissue macrophages play important roles in this inflammatory process. Adipose tissue becomes hypoxic as obesity progresses. We investigated the role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 , a key factor to hypoxic conditions, in myeloid cells using myeloid cell-specific Hif-1 knockout mice (HIF-1 KO). High-fat-diet(HFD) fed HIF-1 KO mice showed improved glucose tolerance and improved insulin sensitivity compared to HFD fed control mice. Inflammatory change was reduced in WAT of HIF-1 KO mice. Angiogenesis was improved and hypoxia was less in WAT of HIF-1 KO mice than in WAT of control mice. In conclusion, HIF-1 in myeloid cells contributes to the development of insulin resistance with inducing inflammatory response and suppressing angiogenesis mediated by adipose tissue hypoxia.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 低酸素 HIF-1 マクロファージ

#### 1. 研究開始当初の背景

肥満に関連した2型糖尿病は増加傾向にあり、糖尿病発症予防や治療といった対策が急務である。肥満により内臓脂肪の脂肪細胞が肥大化すると、全身のインスリン抵抗性が惹起され、糖尿病の発症に関与することが知られている。肥満時の内臓脂肪組織には炎症性のマクロファージ (M1 マクロファージ) が浸潤し、低レベルかつ慢性的な炎症が起こり、インスリン抵抗性の基盤病態を形成する。また、肥満時の脂肪組織は低酸素により誘導される転写因子である低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor) HIF-1 が増加しており、インスリン抵抗性を誘発する機序の一つとして脂肪組織の低酸素が関与することが報告されてきている。しかし、脂肪組織の HIF-1 の由来が脂肪細胞なのかマクロファージを主体とした間質系なのかは明らかにされておらず、脂肪細胞や脂肪組織マクロファージにおける HIF-1 による低酸素応答のインスリン抵抗性についての機能も解明されていない。

#### 2. 研究の目的

本研究では、肥満によって脂肪組織の炎症性マクロファージが爆発的に増加することから、マクロファージの HIF-1 の役割を解明することを目的とする。マクロファージの HIF-1 による低酸素反応が脂肪組織におけるインスリン抵抗性誘発に係わる機序について解析を行うと共に、全身の糖代謝・インスリン抵抗性に与える影響について検討する。

#### 3. 研究の方法

マクロファージ・骨髄球特異的に HIF-1 を欠損している HIF-1 floxed/floxed LysM-Cre マウス (HIF-1KO マウス) と HIF-1 floxed/floxed マウス (野生型マウス) を用いて、高脂肪食飼育により肥満を誘導し、マウスの表現型、脂肪組織の解析 (組織像、低酸素状態、遺伝子発現の変化など)、脂肪組織マクロファージの解析、骨髄由来マクロファージを用いた *in vitro* での分子メカニズムの解析を行なう。

(1) HIF-1KO マウスと野生型マウスのオスを通常食群と高脂肪食群に割り振り、4 群で表現型の解析を行った。

6週齢から18週間の通常食または高脂肪食飼育を行い体重・摂餌量を評価した。18週の食事負荷後に糖負荷試験、インスリン負荷試験により全身の耐糖能・インスリン抵抗性を評価し、ウエスタンブロット法により脂肪組織・肝臓・骨格筋のインスリンシグナルを評価した。脂肪組織・肝臓・骨格筋における遺伝子発現の変化を解析した。脂肪組織においては、組織染色により脂肪細胞の大きさの比較、慢性炎症の指標である王冠様構造 (CLS) の数、血管新生を評価し、Pimonidazole

を用いて低酸素および血流量を評価した。脂肪組織からマクロファージや脂肪細胞などの細胞分画を単離し、炎症や代謝マーカー、血管新生因子などの遺伝子発現を比較した。

(2) 高脂肪食の程度による影響を検討するため、HIF-1KO マウスと野生型マウスのオスを脂肪成分 30%の高脂肪食 (30% HFD) と脂肪成分 60%の高脂肪食 (60% HFD) で飼育し、表現型を比較した (上記 ~ )。

(3) HIF-1KO マウス、野生型マウスそれぞれから骨髄由来マクロファージを分化、培養し、低酸素刺激によるマクロファージの反応を Realtime PCR 法によって解析し、比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 全身の耐糖能・インスリン抵抗性への影響

HIF-1KO マウスと野生型マウスのオスを通常食群と高脂肪食群に割り振り、4 群で表現型の解析を行った。18 週間の高脂肪食投与では HIF-1KO マウスは野生型マウスと比較し体重増加や摂餌量には差を認めなかったが、糖負荷試験およびインスリン負荷試験において血糖値が低下し全身の耐糖能・インスリン抵抗性が改善していた。脂肪組織、肝臓、骨格筋におけるインスリンシグナルは、HIF-1KO マウスにおいて野生型マウスよりもウエスタンブロット法での pAkt が増加しておりインスリンシグナルの増強を認めた。通常食群では HIF-1KO マウスは野生型マウスと比較し耐糖能は変わらず、体重や摂餌量への影響も認めなかった。また 30% HFD と 60% HFD を用いて脂肪含有量の異なる高脂肪食で比較したところ、60% HFD において HIF-1KO マウスと野生型マウスの耐糖能の差が拡大した。この結果から、60% HFD による高脂肪食マウスを中心に脂肪組織の解析を行った。

(2) 脂肪組織の変化

脂肪組織炎症への影響：高脂肪食投与後の脂肪組織では、HIF-1KO マウスは野生型マウスと比較し炎症性サイトカインや M1 マクロファージマーカー、酸化ストレス関連の遺伝子発現が低下した。組織染色では CLS 数が減少しており、HIF-1KO マウスで脂肪組織の炎症の軽減を認めた。また脂肪細胞の大きさには差を認めなかったものの HIF-1KO マウスでは GLUT4 や PPAR などの遺伝子発現が上昇しており、慢性炎症における脂肪細胞の機能障害が改善することが示唆された。

低酸素、血管新生への影響：高脂肪食投与後、低酸素プローブである Pimonidazole の脂肪組織への取り込みは HIF-1KO マウスにおいて野生型マウスよりも減少し、低酸素状態が軽減していた。これに一致して HIF-1KO マウスの脂肪組織では低酸素関連の遺伝子発現の低下を認めた。通常食投与後に比べ高脂

肪食投与では脂肪組織の血管新生因子の遺伝子発現が低下するが、高脂肪食投与後の HIF-1 KO マウスでは野生型マウスと比較しいくつかの血管新生因子の発現が上昇していた。脂肪組織の血管数や血流量は野生型マウスよりも HIF-1KO マウスの脂肪組織で増加しており、脂肪組織の血管新生の改善を認めた。血管新生因子のうち HIF-1 の転写制御を受ける VEGFa の遺伝子発現は HIF-1KO マウスの脂肪組織において野生型マウスよりも低下していた。脂肪組織の細胞分画で遺伝子発現を解析した結果、HIF-1KO マウスでは野生型マウスに比べマクロファージ分画での VEGFa の遺伝子発現が低下したが、前駆脂肪細胞分画においては VEGFa やその他の血管新生因子の遺伝子発現が上昇していた。以上の結果から、HIF-1KO マウスの脂肪組織における血管新生の増強は前駆脂肪細胞の機能変化を介したものであると示唆された。

### (3)マクロファージの炎症反応への影響

骨髄由来マクロファージ (BMDM) は低酸素刺激によって炎症性サイトカインの遺伝子発現が上昇するが、HIF-1KO マウスの BMDM は IL-1 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が著明に低下した。すなわち HIF-1KO マウスでは肥満時の脂肪組織低酸素に対して HIF-1 欠損マクロファージからの炎症性サイトカインの分泌が低下したために、脂肪組織の炎症が軽減したと考えられた。

以上の結果から、脂肪組織の肥大化に伴う低酸素環境において、マクロファージの HIF-1 の欠損によって脂肪組織の炎症が軽減し、脂肪細胞や前駆脂肪細胞の機能保持を介する血管新生増強が起こり、低酸素が軽減し、さらなる炎症の軽減につながることを示唆された。これらの複合的な効果により全身の糖代謝、インスリン抵抗性が改善したと考えられる。

本研究は脂肪組織マクロファージの HIF-1 について検討した世界でも初めての研究であり、研究成果を投稿準備中である。マクロファージの HIF-1 を抑制することによって肥満時の脂肪組織の炎症が軽減し、インスリン抵抗性の改善が得られるという本研究の成果は、インスリン抵抗性の改善・糖尿病発症の予防につながる基礎的研究として意義が大きいと考えられる。

### 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 2 件)

Senda S, Inoue A, Mahmood A, Suzuki R, Kamei N, Kubota N, Watanabe T, Aoyama M, Nawaz A, Ohkuma Y, Tsuneyama K, Koshimizu Y, Usui I, Saeki K, Kadowaki T and Tobe K. Calorie restriction-mediated restoration

of hypothalamic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation is not effective for lowering the body weight set point in IRS-2 knockout obese mice. *Diabetology International* February 2015. Published online: 7 February 2015. *Diabetol Int.* DOI 10.1007/s13340-015-0205-3 査読有り

Takikawa A, Usui I, Fujisaka S, Ikutani M, Senda S, Hattori S, Tsuneyama K, Koshimizu Y, Inoue R, Tanaka-Hayashi A, Nakagawa T, Nagai Y, Takatsu K, Sasaoka T, Mori H, Tobe K. Deletion of SIRT1 in Myeloid Cells Impairs Glucose Metabolism with Enhancing Inflammatory Response to Adipose Tissue Hypoxia. *Diabetology International* 2015:213, Published online, DOI:10.1007/s13340-015-0213-3 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

発表者: 瀧川章子、仙田駿子

発表表題: Myeloid Cell-specific HIF-1 $\square$  Deletion Protected against Insulin Resistance with Increased Angiogenesis in High Fat-fed Mice

学会: American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions (第 75 回アメリカ糖尿病学会学術集会)

発表年月日: H27 年 6 月 5-9 日

発表場所: ボストン

発表者: 瀧川章子、仙田駿子

発表表題: マクロファージ特異的 HIF-1 欠損による食餌性肥満マウスの糖代謝・脂肪組織への影響

学会: 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会

発表年月日: H27 年 5 月 21-23 日

発表場所: 下関

発表者: 瀧川章子、仙田駿子

発表表題: マクロファージ特異的 HIF-1 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する

学会: 第 88 回日本内分泌学会学術総会

発表年月日: H27 年 4 月 24 日

発表場所: 東京

発表者: 瀧川章子、仙田駿子

発表表題: マクロファージ特異的 HIF-1 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する

学会: 日本肥満学会第 19 回アディポサイエンス・シンポジウム

発表年月日: H26 年 8 月 23 日

発表場所: 大阪

発表者: 瀧川章子、仙田駿子

発表表題: Myeloid Cell-Specific Deletion of Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha Gene Protected against Diet-Induced Insulin Resistance in Mice

学会: American Diabetes Association's 74th Scientific Sessions (第 74 回アメリカ

カ糖尿病学会学術集会)

発表年月日：H26年6月15日

発表場所：サンフランシスコ

発表者：瀧川章子、仙田聡子

発表表題：脂肪組織の慢性炎症における低  
酸素とマクロファージの関連

学会：第57回日本糖尿病学会年次学術集  
会

発表年月日：H26年5月24日

発表場所：大阪

〔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 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仙田 聡子 (SENDA, Satoko)

富山大学 附属病院 短時間勤務医師

研究者番号：40597770

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし