

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461327

研究課題名(和文) M2マクロファージの2型糖尿病発症における役割

研究課題名(英文) The role of M2-like macrophages in glucose metabolism

研究代表者

戸辺 一之 (TOBE, Kazuyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：30251242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：M2マクロファージの脂肪組織での役割を明らかにすることを目的としてM2マクロファージを一過性に除去するマウスの作製を試みた。CD206がM2マクロファージに特異度の高いことを利用して、脂肪組織CD206遺伝子プロモーターの下流にジフテリアトキシン(DT)受容体を発現する遺伝子改変マウス(CD206DTRマウス)を作製した。実際、本マウスにDTを投与によりM2マクロファージを除去するとインスリン感受性が亢進し耐糖能が改善をしていた。肥満状態でも同様の結果であり、脂肪組織の炎症はむしろ抑制された。M2マクロファージが抗炎症作用以外の作用でインスリン感受性の維持に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue resident macrophages (ATMs) play important roles in regulating insulin sensitivity via their anti-inflammatory actions. However, the mechanism by which ATMs affect the functions of adipocytes is largely unknown. Here, we show that the CD206/TGF pathway plays critical roles in regulating adipogenesis and glucose homeostasis. Adipose tissue CD206+ cells were determined to be exclusively M2 macrophages, and a reduction in their number improved systemic insulin sensitivity, which was associated with an increased number of smaller adipocytes. The genetically engineered CD206+cells-reduced mice showed a down-regulation of TGF signaling in adipose tissue, which was accompanied by up-regulated proliferation and differentiation of adipocyte progenitors (APs), thereby providing increased numbers of smaller adipocytes. Our findings indicate that CD206+ cells regulate APs' growth/differentiation and thereby control adiposity and systemic insulin sensitivity.

研究分野：糖尿病学

キーワード：インスリン抵抗性 M2マクロファージ

#### 1. 研究開始当初の背景

脂肪組織における M2 マクロファージ (Adipose Tissue M2 Macrophage : ATM・M2・M )は、非肥満時には組織の恒常性の維持を通じて、肥満時には抗炎症性サイトカインの分泌、あるいはエネルギー過剰による脂肪組織の障害からの回復の促進によりインスリン感受性を保つ作用があると考えられてきた。実際に、非肥満から肥満に至る過程で、抗炎症性の M2・M から炎症性の M1・M に変換するという知見 ((Fujisaka et al., Diabetes, 2009; Fujisaka et al., Endocrinology, 2011; Fujisaka et al., Diabetol Int, 2016, Fujisaka et al., Diabetologia, 2013; Takikawa et al., Diabetes, 2016; Takikawa et al., Diabetol Int, 2016)はこの仮説を支持している。一方、エネルギー過剰の肥満状態において、M2 マクロファージは TGF などの分泌を介して、組織修復の過程で線維化を誘導し、インスリン抵抗性や臓器障害の増悪に関与しているとも報告されている。このように、上記の M2・M 善玉説とは逆の考え方もあり様々な病態における M2 マクロファージの役割については、一定の見解が得られてはいない。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、2 型糖尿病・メタボリック症候群における糖代謝および肥満度の調節における M2・M の役割を明らかにすることである。

#### 3. 研究の方法

M2 マクロファージのマーカーである CD206 遺伝子のプロモーターの下流にジフテリア毒素 (DT) 受容体 cDNA を組み込んだマウス (CD206-DTR) を作製した。通常食下のマウスの脂肪組織では、CD206 細胞の 95%以上が F4/80 を発現するマクロファージで、M2 マーカー遺伝子が高発現している。このマウスを用いてジフテリア毒素を投与し、M2 マクロファージを一過性に除去し糖代謝および体脂肪量の調節の効果を検討する。通常食非肥満状態と高脂肪食負荷肥満時において検討する。

#### 4. 研究成果

通常食下で、ジフテリア毒素 (DT) を投与し主に M2 マクロファージを ablate したところ、驚いたことに耐糖能が改善していたインスリン感受性が亢進していた。脂肪組織では、小型脂肪細胞の出現とともに adiponectin、PGC-1、Glut4 などの「代謝が良好であることを示す遺伝子群」の発現が亢進し、前駆脂肪細胞が増殖し増加をしていた (Nature Communications under revision)。以上の結果より、M2 マクロファージは抗炎症作用以外の機能を有し、その作用で個体のインスリン感受性や肥満度を調節しているという仮説に至っている。

さらに、高脂肪食下において M2 マクロファージを除去したところ、耐糖能とインスリン抵抗性が改善していた。驚いたことに、脂肪組織の炎症が改善していた。この結果より、M2 マクロファージは抗炎症作用以外の作用により個体のインスリン感受性を調節しているという仮説を裏付ける。M2 マクロファージの一過性の除去をしたマウスの脂肪組織をフローサイトメトリーにて解析し、PDGFR<sup>+</sup>Scal<sup>+</sup>の前駆脂肪細胞分画の細胞数が増加していることから、通常は M2 マクロファージが前駆脂肪細胞の増殖と脂肪細胞への分化の抑制がしているが、M2 マクロファージの除去により解除され、脂肪細胞の分化が亢進し、Adiponectin、PGC-1、Glut4 などの「代謝が良好であることを示す遺伝子群」の発現が増加しインスリン抵抗性を改善したものと考えられた。

これらの実験結果は、Nature Communications に投稿され現在、revise 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 11 件)

1. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1 in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. Diabetes. 65(12):3649-3659. 2016 査読あり DOI:10.2337/db16-0012
2. 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. Diabetol Int. 2016 7(1):59-68. 査読あり DOI:10.1007/s13340-015-0213-3
3. Fujisaka S, Usui I, Nawaz A, Takikawa A, Kado T, Igarashi Y, Tobe K. M2 macrophages in metabolism. Diabetes Int. 2016 Nov 1;7:342-51. 査読あり DOI:10.1007/s13340-016-0290-y
4. Yamamoto M, Hikosaka K, Mahmood A, Tobe K, Shojaku H, Inohara H, Nakagawa T. Nmnat3 Is Dispensable in Mitochondrial NAD Level Maintenance In Vivo. PLoS One. 2016 11(1):e0147037. 査読あり

- DOI:10.1371/journal.pone.0147037
5. Imamura M, Tobe K, (63 人中 46 番目). Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes. *Nat Commun*. 2016 7:10531. 査読あり DOI:10.1038/ncomms10531
  6. Kamura Y, Iwata M, Maeda S, Shinmura S, Koshimizu Y, Hounoki H, Fukuda K, Ishiki M, Usui I, Fukushima Y, Takano A, Kato H, Murakami S, Higuchi K, Kobashi C, Tobe K. FTO gene polymorphism is associated with Type 2 diabetes through its effect on increasing the maximum BMI in Japanese men. *PLOS ONE*. 2016. 11(11):e0165523. 査読あり DOI:10.1371/journal.pone.0165523
  7. Kubota T, Tobe K. (13 人中 11 番目). Pioglitazone ameliorates smooth muscle cell proliferation in cuff-induced neointimal formation by both adiponectin-dependent and-independent pathways. *Sci Rep*. 6:34707, 2016. 査読あり DOI:10.1038/srep34707
  8. Kambara K, Ohashi W, Tomita K, Takashina M, Fujisaka S, Hayashi R, Mori H, Tobe K, Hattori Y. In vivo depletion of CD206+ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. *Am J Pathol*. 2015 185(1):162-71. 査読あり DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.09.005
  9. 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, 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 knock out obese mice. *Diabetol Int*. 2015 6(4):321-35. 査読あり DOI:10.1007/s13340-015-0205-3
  10. Motonishi S, Nangaku M, Wada T, Ishimoto Y, Ohse T, Matsusaka T, Kubota N, Shimizu A, Kadowaki T, Tobe K, Inagi R. Sirtuin1 maintains actin cytoskeleton by deacetylation of cortactin in injured podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2015 26(8):1939-59. 査読あり DOI: 10.1681/ASN.2014030289
  11. Yoon MJ, Yoshida M, Johnson S, Takikawa A, Usui I, Tobe K, Nakagawa T, Yoshino J, Imai S. SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD(+) and Function in Mice. *Cell Metab*. 2015 21(5):706-17. 査読あり DOI: 10.1016/j.cmet.2015.04.002
- [学会発表](計 26 件)
1. 瀧川章子, 薄井 勲, 張 群, 岡部圭介, 角 朝信, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 常山幸一, 戸邊一之. 肥満症・糖尿病での肝がん発症におけるマクロファージ HIF-1 の働き. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2016 May 19-21; 京都府京都市.
  2. 岡部圭介, 岩田 実, 渡邊善之, 中嶋 歩, 角 朝信, 瀧川章子, 朴木久恵, 小清水由紀子, 石木 学, 薄井 勲, 戸邊一之. 2 型糖尿病患者の内因性インスリン分泌評価指標に及ぼす腎機能の影響. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2016 May 19-21; 京都府京都市.
  3. Takikawa A, Usui I, Zhang Q, Okabe K, Kado T, Nawaz A, Fujisaka S, Nakagawa T, Tsuneyama K, Tobe K. Myeloid cell-specific HIF-1 deletion decreases the number of liver tumors in high fat-fed mice. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association; 2016 Jun 10-14; New Orleans (USA).
  4. Okabe K, Usui I, Tobe K, Nakagawa T. Nampt-mediated NAD synthesis regulates the metabolic remodeling during the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association; 2016 Jun 10-14; New Orleans (USA).
  5. 瀧川章子, 薄井 勲, 張 群, 岡部圭介, 角 朝信, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 常山幸一, 戸邊一之. 肥満症・糖尿病での肝がん発症におけるマクロファージ HIF-1 の働き. 第 34 回内分泌代謝学サマーセミナー; 2016 Jul 14-16; 福岡県糟屋郡.
  6. 瀧川章子, 藤坂志帆, 薄井 勲, 戸邊一之. 脂肪組織の病的肥大におけるマクロファージ HIF-1 の働き. 第 21 回アディポサイエンス・シンポジウム(招待講演); 2016 Aug 20; 大阪府豊中市.
  7. 岡部圭介, 薄井 勲, 戸邊一之, 中川 崇. Nampt-mediated NAD synthesis regulates the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes via poly(ADP-ribosylation) by PARPs. 第 21 回アディポサイエンス・シンポジウム; 2016 Aug 20; 大阪府豊中市.
  8. 瀧川章子, Arshad Mahmood, Allah Nawaz, 岡部圭介, 角 朝信, 中川 崇, 藤坂志帆, 薄井 勲, 戸邊一之. 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. 第

- 37 回日本肥満学会；2016 Oct 7-8；東京都江東区。
9. 瀧川章子, Arshad Mahmood, Allah Nawaz, 角 朝信, 薄井 勲, 戸邊一之. マクロファージ特異的 HIF-1 alpha 欠損は高脂肪食負荷マウスの糖代謝を改善する. 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会；2015 Feb 13-14；京都府京都市.
  10. 瀧川章子, Arshad Mahmood, Allah Nawaz, 角 朝信, 仙田聡子, 薄井 勲, 合田巨人, 戸邊一之. 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. 第 88 回日本内分科学会学術総会；2015 Apr 23-25；東京都千代田区.
  11. 薄井 勲, 瀧川章子, 戸邊一之. 老化のサイエンス Sirtuin 研究の深化と展望マクロファージ SIRT1 による糖代謝制御. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会；2015 May 21-25；山口県下関市.
  12. Ishiki M, Nishida Y, Takikawa A, Kado T, Iwata M, Koshimizu Y, Usui I, Tobe K. The impact of astaxanthin, a strong antioxidant, on glucose metabolism in vivo. The second Japan-Korea Diabetes Forum；2015 May 22；Shimonoseki (JAPAN).
  13. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Senda S, Okabe K, Usui I, Tobe K. Myeloid cell-specific HIF-1 alpha deletion protected against insulin resistance with increased angiogenesis in high fat-fed mice. 75th scientific sessions of American Diabetes Association；2015 Jun 5-9；Boston (USA).
  14. Okabe K, Iwata M, Nakashima A, Shinmura S, Kado T, Wakura T, Takikawa A, Koshimizu Y, Hounoki H, Ishiki M, Fukuda K, Usui I, Tobe K. The effect of renal function on  $\beta$ -cell function related parameters in Japanese type 2 diabetic patients. 75th scientific sessions of American Diabetes Association；2015 Jun 5-9；Boston (USA).
  15. 薄井 勲, 瀧川章子, 戸邊一之. 肥満における臓器障害 - 肥満における脂肪組織マクロファージの機能. 第 36 回日本肥満学会；2015 Oct 2-3；愛知県名古屋市.
  16. 薄井 勲, 瀧川章子, 戸邊一之. 肥満糖尿病マウスの脂肪組織低酸素シグナルと慢性炎症に関する研究. 第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(シンポジウム)；2014 Feb 14-15；宮崎県宮崎市.
  17. 瀧川章子, Mahmood A, 藤坂志帆, 仙田聡子, Aminuddin, 中川 崇, 薄井 勲, 戸邊一之. 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. 第 51 回日本臨床分子医学会学術集会；2014 Apr 11-12；東京都千代田区.
  18. 薄井 勲, 瀧川章子, 戸邊一之. 肥満脂肪組織の慢性炎症と低酸素シグナル. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム)；2014 May 22-24；大阪府大阪市.
  19. 瀧川章子, 薄井 勲, 藤坂志帆, Mahmood A, 仙田聡子, Aminuddin, 岡部圭介, 角朝信, 小清水由紀子, 戸邊一之. 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. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会；2014 May 22-24；大阪府大阪市.
  20. 角 朝信, 福田一仁, 新村里美, 和倉健朗, 岡部圭介, 岩田 実, 石木 学, 薄井 勲, 戸邊一之. 糖毒性解除前後におけるグルカゴン負荷試験 CPI の治療選択における有用性. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会；2014 May 22-24；大阪府大阪市.
  21. Aminuddin, Takikawa A, Usui I, Fujisaka S, Mahmood A, Nawaz A, Tobe K. Depletion of CD206-positive cells is associated with increased white adipose tissue proliferation. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会；2014 May 22-24；大阪府大阪市.
  22. Mahmood A, Senda S, Nakagawa T, Fujisaka S, Takikawa A, Aminuddin A, Nawaz A, Usui I, Tobe K. Myeloid-Specific deletion of Hypoxia-inducible factor 1-alpha gene protected against Diet induced Insulin resistance. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会；2014 May 22-24；大阪府大阪市.
  23. Ishiki M, Nishida Y, Takikawa A, Koshimizu Y, Iwata M, Usui I, Tobe K. Astaxanthin, a strong antioxidant, ameliorated glucose metabolism in obese mouse through various mechanisms. 74th scientific sessions of American Diabetes Association；2014 Jun 13-17；San Francisco (USA).
  24. Takikawa A, Mahmood A, Fujisaka S, Nakagawa T, Senda S, Aminuddin A, Usui I, Tobe K. Myeloid cell-specific deletion of hypoxia-inducible factor 1-alpha gene protected against diet-induced insulin resistance in mice. 74th scientific sessions of American Diabetes Association；2014 Jun 13-17；San Francisco (USA).
  25. 瀧川章子, Mahmood A, 薄井 勲, 戸邊一之. 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. 日本内分科学会第 32 回内分

代謝学サマーセミナー；2014 Jul  
10-12；山梨県南都留郡。

26. 瀧川章子, Mahmood A, 仙田聡子, 薄井  
勲, 戸邊一之. 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. 日本肥満学会第 19 回  
アディポサイエンス・シンポジウム；  
2014 Aug 23；大阪府豊中市。

〔図書〕(計 0 件)

〔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：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸邊 一之 (TOBE, Kazuyuki)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授  
研究者番号：3 0 2 5 1 2 4 2

### (2) 研究分担者

瀧川 章子 (TAKIKAWA, Akiko)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
客員助教  
研究者番号：8 0 6 4 7 4 5 4

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )