

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560408

研究課題名(和文)肥満児はなぜアレルギーになりやすいのか? -高糖質食と脂肪組織との関連について-

研究課題名(英文)Why are overweight children liable to induce allergies? -Relationship between high-carbohydrate diets and adipose tissues-

研究代表者

服部 秀美 (HATTORI, Hidemi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・防衛医学研究センター・助教)

研究者番号：80508549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：過剰な糖質を摂取すると脂肪組織にエネルギーとして蓄積されるだけでなく、アレルギーを誘発するのではないかとされている。そこで、脂肪組織とアレルギーの関係性を調べるために、グルコースと線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) の脂肪細胞及び脂肪組織由来間質細胞に対する影響を *in vitro* で調べた。グルコースや FGF-2 は、IL-6、MCP-1、KC、eotaxin の分泌能に影響を与えることが分かった。日常的に高糖質の食事を摂取している肥満児が、急に糖質制限及び低タンパク質の食事をすると、脂肪組織からサイトカイン・ケモカインが過剰に分泌されることでアレルギーが誘発されるのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Excessive carbohydrate intake not only leads to store to adipose tissues as energy but also induces allergies. This study examined glucose- and fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-induced cytokine and chemokine expression in adipocytes or adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* to clarify the relationship between adipose tissue and allergies. Glucose and FGF-2 affected cytokine and chemokine secretion, including interleukin-6, monocyte chemotactic protein-1, keratinocyte-derived chemokine, and eotaxin. Allergies will be presumably induced by excess cytokine and chemokine secretion from adipose tissues when overweight children regularly eating high-carbohydrate diets suddenly switch to low-carbohydrate and protein diets.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪細胞 脂肪組織由来間質細胞 グルコース 線維芽細胞増殖因子 エオタキシン サイトカイン
アレルギー

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの子供が給食を食べて死亡するなど、アレルギー患者の増加が深刻な社会問題となっている。アレルギー患者の増加の原因には、衛生環境の改善や食品添加物など様々な要因があるといわれ、近年では、肥満とアレルギーの関連について注目されている。肥満児とアレルギー発症には相関があり、特に成長過程の肥満児は、食物アレルギーになりやすいとの報告もある。脂肪組織は、これまで単純なエネルギー貯蔵庫という役割にすぎないと思われていたが、最近では、生理活性を有する様々なサイトカイン・ケモカイン等の内分泌機能を司る重要な組織であると認識されつつある。過剰な糖質を摂取すると脂肪組織にエネルギーとして蓄積されるだけでなく、アレルギーになるリスクが高いといわれている。

ケモカインの一つであるエオタキシンは、アレルギー反応で組織障害を起こす好酸球を遊走させる作用をもつ。エオタキシンは、線維芽細胞や上皮細胞などから interleukin (IL)-4、IL-9、IL-13 などの刺激によって分泌されると知られており、このシグナル伝達経路として JAK-STAT 経路や MAPK 経路などが関与していると報告されている。

2. 研究の目的

本研究の報告者は、肥満児にアレルギーが多い一つの理由として、糖質の過剰摂取によるものではないかと考えている。過剰な糖質によるエネルギー蓄積によって肥満を導き、蓄積された脂肪組織が、糖質の最終分解産物であるグルコースによって、アレルギーを誘発しているのではないかと推測している。本研究では、グルコースが脂肪組織由来間質細胞 (ASCs) 及び脂肪細胞に与える影響をサイトカイン・ケモカインの分泌能の観点から検討した。

また、エオタキシン発現を促進するサイトカインとして知られている IL-4、IL-9、IL-13 以外にも、エオタキシン分泌作用を有する因子があるのではないかと推測している。細胞増殖因子の一つである線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) は、ASCs から脂肪細胞へと分化させる分化促進作用を持つ。そこで、FGF-2 による ASCs のエオタキシン発現の作用について、シグナル伝達経路の解明を含め検討した。

3. 研究の方法

マウス (C57BL/6 5週令) 鼠蹊部の脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ処理によって、細胞を採取した。採取した細胞を 10% 牛胎児血清 (FBS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で 3 継代培養し、大量培養した細胞を ASCs として用いた。

プレートに播種した ASCs を脂肪細胞分化誘導培地 (20 µg/ml インスリン、1.0 µM デキサメサゾン、0.5 mM 3-イソブチル-1-メチ

ルキサンチン、0.5 mM インドメタシン、10% FBS 含有 DMEM) 及び脂肪細胞維持培地 (20 µg/ml インスリン、10% FBS 含有 DMEM) で 3 日おきに交互に培地交換することによって、脂肪細胞に分化させた。油滴が十分に確認された細胞群を脂肪細胞として用いた。

(1) グルコース濃度 (高濃度: 4.5 g/L、低濃度: 1 g/L) 及び FBS 濃度 (5%、10%) がそれぞれ異なる培地 (DMEM) で ASCs 及び脂肪細胞を 24 時間培養した後、上清を採取した。

(2) 採取した上清中に含まれるサイトカイン、ケモカインを ELISA によって測定した。

(3) 5% FBS 含有 DMEM に FGF-2 を添加した培地を ASCs に添加し、継時的に上清を採取し、エオタキシンの分泌量を ELISA によって定量した。また、FGF-2 の添加量を変えて、24 時間培養後の上清中のエオタキシン分泌量を ELISA で定量した。

(4) シグナル伝達経路を調べるために、(3) と同じ条件で、阻害剤である FGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor、U0126、PD98059、SB203580、AS1517499、NSC74859 を加え、24 時間培養後に細胞を採取し、total RNA を抽出し RT-PCR によりエオタキシンの発現を調べた。プライマーは、
eotaxin-1 (F); tccaaaccataaacaacctcc
eotaxin-1 (R); ctcgtccattgtgttctc
GAPDH (F); tgaaggtcgggtggaacggatttggc
GAPDH (R); catgtaggccatgaggtccaccac
を使用した。さらに上清中のエオタキシン分泌量を ELISA で定量した。

4. 研究成果

(1) グルコースが ASCs に与える影響
マウス ASCs を 10% 及び 5% 牛胎児血清 (FBS) 入り高濃度グルコース培地と低濃度グルコース培地で培養し、その上清中に分泌される

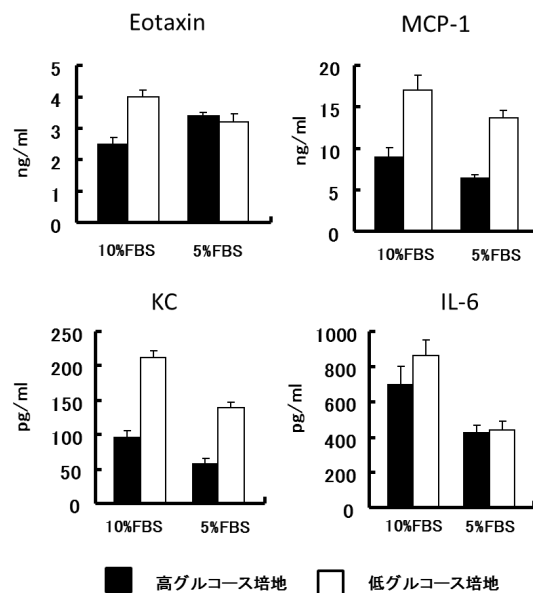


図1. グルコース濃度が異なる場合のASCsのサイトカイン・ケモカイン分泌能の変化

エオタキシン、MCP-1、KC、IL-6を定量した。ASCsは、10%FBS含有DEMEにおいて高濃度のグルコースよりも低濃度のグルコースの条件において、エオタキシン、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、IL-6、keratinocyte-derived chemokine (KC)の分泌量が高くなった(図1)。また、血清濃度を減少させた5%FBS含有DMEMを用いて同様に定量したところ、高濃度のグルコースよりも低濃度のグルコースの条件において、MCP-1、KCの分泌量が高くなった(図1)。

(2) グルコースが脂肪細胞に与える影響
脂肪細胞を(1)と同様に、培地のグルコースとFBSの濃度を変えて、エオタキシン、MCP-1、KC、IL-6の分泌を定量した。脂肪細胞は10%FBS含有DEMEにおいて高濃度のグルコースよりも低濃度のグルコースの培地条件において、IL-6の分泌量が高くなった(図2)。また、血清濃度を減少させた5%FBS含有DMEMを用いて同様に定量したところ、高濃度のグルコースよりも低濃度のグルコースの条件において、MCP-1、KC、IL-6の分泌量が高くなった(図2)。

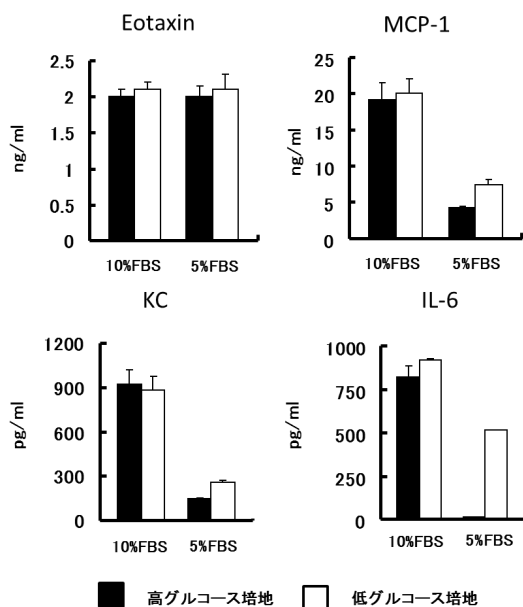


図2. グルコース濃度が異なる場合の脂肪細胞のサイトカイン・ケモカイン分泌能の変化

脂肪細胞及びASCsは、グルコース濃度が低い場合にサイトカイン・ケモカイン分泌能を促進させることが分かり、それはタンパク質濃度においても影響されることが明らかになった。今回は *in vitro* だけの検討であるが、日常的に高糖質の食事を摂取している肥満者が、急に糖質制限及び低タンパク質の食事を摂取した場合、脂肪組織からサイトカイン・ケモカインが過剰に分泌され、それによりアレルギーが誘発されるのではないかと考えられた。

(3) FGF-2によるASCsのエオタキシン発現
ASCsにFGF-2を添加すると濃度依存的及び経時的にエオタキシンの発現が上昇した(図3)。さらに、FGF receptorのinhibitorによって、このエオタキシンの発現は抑制されたことから、FGF-2がエオタキシン発現に関与することが分かった(図4)。

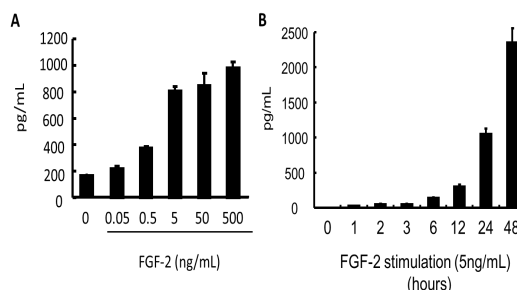


図3. ASCsにFGF-2を添加した時の濃度依存的、経時的エオタキシン分泌能の変化

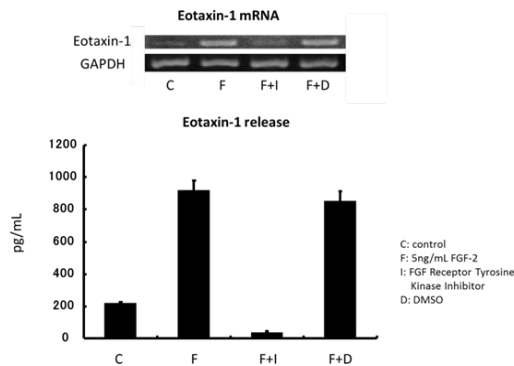


図4. 阻害剤によるエオタキシン発現の影響

シグナル伝達経路を同定するためにSTAT3、STAT6、ERK、p38 MAPK、JNKのinhibitorを使用したところ、ERK inhibitorによって著しくエオタキシンの発現が抑制された。ASCsにおけるFGFによるエオタキシンの発現は、FGF-ERKシグナル経路を介して発現され、JAK-STAT経路は関与していないことが明らかとなった。また、FGFによるIL-4、IL-9及びIL-13の発現は見られなかったことから、ASCsはこれまでに報告されているIL-4、IL13の刺激だけでなくFGF-2などの増殖因子によってもエオタキシンの発現が誘導されることが明らかとなった。FGF-2は、未分化のASCsを脂肪細胞に分化させるだけでなく、エオタキシンの発現も誘発することから、今後は、FGF-2、エオタキシンさらに好酸球の関連を *in vivo* で調べる必要があると考えられた。

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 1 件)

Hidemi Hattori, Masayuki Ishihara, Altered protein secretions during interactions between adipose tissue- or bone marrow-derived stromal cells and inflammatory cells. Stem Cell Res Ther. 2015 6:70. 査読有 DOI: 10.1186/s13287-015-0052-y

〔学会発表〕(計 1 件)

服部 秀美、石原 雅之、線維芽細胞増殖因子によるエオタキシンの発現、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 秀美 (HATTORI, Hidemi)

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・
助教

研究者番号: 80508549