

## 研究報告書

### 「代謝ストレスによる炎症の慢性化機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 菅波孝祥

#### 1. 研究のねらい

脂肪組織は余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積するのみならず、多くのアディポサイトカイン(アディポカイン)を産生・分泌する内分泌器官として多彩な生命現象に関与する。内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームの病態形成に炎症性サイトカインや免疫担当細胞が関与することがよく知られているが、肥満の脂肪組織そのものも慢性炎症性変化(脂肪組織炎症)をきたすことが明らかになった。能動的な炎症収束起点が働く急性炎症と異なり、慢性炎症では、種々のストレスに対する実質細胞と間質細胞の複雑な相互作用が持続し、ダイナミックな形態的变化(組織リモデリング)を介して組織機能障害に至る。実際、肥満の脂肪組織では、脂肪細胞の肥大化、血管新生、多彩な免疫担当細胞の浸潤、細胞外マトリックスの過剰産生などが認められ(脂肪組織リモデリング)、動脈硬化における血管壁リモデリングと酷似している。このような脂肪組織炎症の結果、アディポサイトカイン産生調節(内分泌機能)や脂肪蓄積能(代謝機能)が障害され、全身の糖脂質代謝異常や臓器機能不全が生じると想定される。即ち、アディポサイトカインや遊離脂肪酸をメディエーターとする複雑な臓器代謝ネットワークにより、脂肪組織から全身臓器に慢性炎症が波及・拡大すると捉えることができるが、その実態や分子機構は未だ不明の点が多い。

一方、個々の細胞における炎症の慢性化機構も十分に分かっていない。例えば、遊離脂肪酸は脂肪組織に由来する脂質アディポサイトカインであり、特に飽和脂肪酸による慢性炎症が注目されている。しかしながら、脂肪酸の作用は複数の受容体や種々の中間代謝産物を介するなど一様ではない。また、脂肪酸の量的変化のみならず、鎖長や不飽和度などの質的变化がメタボリックシンドロームの病態形成に重要であることも報告されている。本研究では、「遊離脂肪酸の流れ」に注目し、メタボリックシンドロームにおける炎症遷延化の分子機構の解明を目的とする。脂肪酸はメタボリックシンドロームの病態基盤である「脂肪の過剰蓄積」と「慢性炎症」を繋ぐ鍵分子であることより、本研究の成果は、様々な代謝ストレスにより惹起されるメタボリックシンドロームの分子機構の解明のプロトタイプとなり、新しい治療戦略の開発に向けた基盤技術の確立に繋がることが期待される。

#### 2. 研究成果

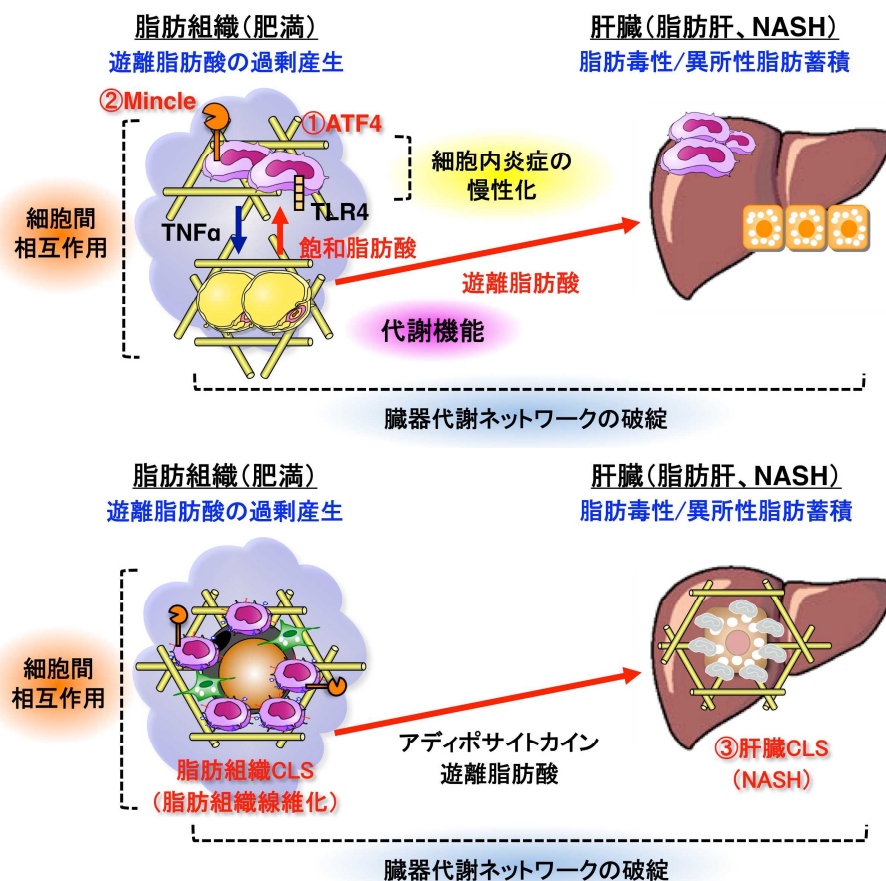
##### (1) 概要

我々は、肥満の脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージの細胞間相互作用により脂肪組織炎症が惹起されることを明らかにしてきた。特に、脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸がグラム陰性桿菌に対する病原体センサーの Toll-like receptor 4(TLR4)を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生を誘導すること、TLR4 シグナル欠損マウスは脂肪組織炎症が軽減し、アディポサイトカイン産生調節や全身の糖代謝が改善することを見出した。本研究で

は、「遊離脂肪酸の流れ」に注目し、細胞内、細胞間、臓器間それぞれの階層におけるメカニズムが複雑に絡み合って形成されるメタボリックシンドロームの新たな分子機序を検討した。

まず、細胞内炎症の分子機構として、飽和脂肪酸が TLR4 非依存的にストレス誘導性転写因子 activating transcription factor 4(ATF4)を活性化し、炎症性サイトカインの発現を増強することを見出した。ATF4 は、interleukin-6(IL-6)のプロモーター上における直接作用と、NF- $\kappa$ B の核移行を促進する間接作用の両面により、IL-6 の転写を活性化した。次に、脂肪細胞とマクロファージの相互作用により誘導される脂肪組織線維化の分子機構を明らかにした。一般に、慢性炎症は組織線維化を招来するが、肥満の脂肪組織も例外ではない。病原体センサーの Mincle は、脂肪組織炎症の起点となる crown-like structure (CLS)を構成する炎症促進性マクロファージに局在し、脂肪組織線維化の主要な制御分子であることを見出した。さらに、脂肪組織線維化が、脂肪蓄積能を障害することにより遊離脂肪酸の放出を促進し、肝臓への異所性脂肪蓄積をもたらす新たな臓器連関を明らかにした。

このように、本研究において、飽和脂肪酸により誘導される細胞内炎症の慢性化機構、脂肪組織の細胞間相互作用がもたらす持続的な遊離脂肪酸の過剰産生機構、臓器代謝ネットワークの破綻による異所性脂肪の蓄積の分子機構が明らかとなり、代謝ストレスによる炎症の慢性化機構の解明に貢献した(図)。



- ①飽和脂肪酸-ATF4経路による細胞内炎症の分子機構 (*Diabetes* 63:152-161, 2014)
- ②脂肪組織線維化による異所性脂肪蓄積の分子機構 (*Nat. Commun.* 5:4982, 2014)
- ③肝臓CLSを起点とするNASH発症の分子機構 (*PLoS ONE* 8:e82163, 2013)

## (2) 詳細

我々は、肥満の脂肪組織に浸潤したマクロファージと脂肪細胞の細胞間相互作用に注目して、脂肪組織炎症の分子機構を明らかにしてきた。特に、脂肪細胞とマクロファージが、飽和脂肪酸と tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) に代表される液性因子を介して相互作用することにより、vicious cycle を形成して持続的な炎症反応をもたらすことを提唱した (*Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, 2005)。さらに、飽和脂肪酸がグラム陰性桿菌に対する病原体センサーの TLR4 を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生を誘導すること、TLR4 シグナルを欠損するマウスは脂肪組織炎症が軽減し、アディポサイトカイン産生調節や全身の糖代謝が改善することを見出した (*Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, 2007)。本研究では、「遊離脂肪酸の流れ」に注目し、細胞内、細胞間、臓器間それぞれの階層におけるメカニズムが複雑に絡み合って形成されるメタボリックシンドロームの病態の新たな理解を目的とした。具体的には、飽和脂肪酸により誘導される細胞内炎症の慢性化機構、脂肪組織の細胞間相互作用がもたらす持続的な遊離脂肪酸の過剰産生機構、臓器代謝ネットワークの破綻による異所性脂肪の蓄積の分子機構を検討し、以下のような成果を得た。

### A. ストレス誘導性転写因子 ATF4 による炎症制御機構に関する検討(論文 3)

TLR4 欠損マクロファージにおいても飽和脂肪酸による炎症性サイトカイン産生が認められるため、遺伝子発現アレイ解析を行ったところ、転写因子 NF- $\kappa$ B および ATF4 の標的遺伝子が多く含まれることを見出した。ATF4 は、小胞体ストレスや酸化ストレスな種々の代謝ストレスにより誘導される統合的ストレス応答経路 (integrated stress response) の中核を成す。実際、飽和脂肪酸の添加により、ATF4 の上流である eIF2 $\alpha$  リン酸化が TLR4 非依存性に誘導され、ATF4 の既知の下流標的である Trib3 や Chop の発現が上昇した。これに対して、一価あるいは多価不飽和脂肪酸は ATF4 経路を活性化せず、むしろ、飽和脂肪酸に拮抗的に作用した。ATF4 ホモ欠損マウスは、著しい骨格系の異常によりほとんど産仔が得られないため、ヘテロ欠損マウスを用いて ATF4 の機能的意義を検討した。ATF4 欠損マクロファージでは、飽和脂肪酸や小胞体ストレス誘導剤による炎症性サイトカインの発現が顕著に抑制されたが、LPS に対する反応は正常に保たれていた。同様の結果は、個体レベルにおいても観察され、代謝ストレスにより誘導される炎症反応において ATF4 が重要な役割を果たすことが示唆された。この分子メカニズムとして、IL-6 のプロモーター上に ATF4 がリクルートされ直接的に転写を活性化させること、ATF4 が NF- $\kappa$ B の核移行を促進することなど複数の機序が存在することを明らかにした。このように、代謝ストレスは ATF4 を介して TLR4 シグナルを増強する可能性があり、メタボリックシンドロームにおける意義が示唆される(図①)。

### B. 病原体センサー Mincle による脂肪組織線維化の分子機構に関する検討(論文 2)

脂肪組織炎症の新たな制御因子を探索する目的で、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いて遺伝子発現アレイ解析を施行し、macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) に着目した。Mincle は、結核菌や病原性真菌に対する病原体センサーであることが報告されていたが、死細胞を認識する可能性も指摘されていた。しかしながら、非感染性炎症における Mincle の意義は全く不明であった。我々は、肥満マウスおよび肥満症例の脂肪組織において



Mincle の発現が亢進し、特に、CLS を構成する炎症促進性 M1 マクロファージに局在することを見出した。Mincle 発現は飽和脂肪酸-TLR4-NF- $\kappa$ B 経路により誘導され、実際、TLR4 シグナルを欠損するマウスでは Mincle の発現誘導が顕著に抑制された。Mincle 欠損マウスに高脂肪食を負荷して肥満を誘導したところ、マクロファージの細胞数には変化を認めなかったが、CLS 形成や脂肪組織線維化が強力に抑制された。実際、外因性 Mincle リガンドである結核菌の構成成分、trehalose-6,6'-dimycolate (TDM) を用いてマクロファージを刺激すると、炎症性サイトカインやケモカインに加えて、TGF- $\beta$  や TIMP-1 などの線維化促進分子の発現が誘導された。さらに、非肥満マウスの脂肪組織に TDM を注入したところ、CLS 形成を伴う間質線維化が認められた。従来より、CLS は脂肪組織炎症の起点となることが知られていたが、本研究により、脂肪組織局所において CLS を中心として間質線維化が生じることが初めて明らかになった(図②)。

#### C. 脂肪組織線維化による異所性脂肪蓄積の新たな分子機構に関する検討(論文 2)

余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積し、栄養欠乏状態には、遊離脂肪酸として全身臓器にエネルギーを供給することは脂肪組織の最も重要な機能(代謝機能)である。これは、主にインスリンによる脂肪合成と交感神経系を介する脂肪分解により巧妙に制御されており、このバランスが破綻すると、肝臓や骨格筋などの非脂肪組織に異所性に沈着して(異所性脂肪蓄積)、臓器の機能障害をきたす(広義の脂肪毒性)。最近、このプロセスに慢性炎症が関与するという知見が集積しつつある。例えば、肥満症例や肥満マウスにおいて、脂肪組織の線維化が異所性脂肪蓄積と正の相関を示すことが報告されている。また、脂肪組織に特徴的な VI 型コラーゲンを欠損するマウスは、高脂肪食負荷により脂肪細胞がより肥大化する一方、異所性脂肪が減少し、糖代謝も良好に保たれるという。従来、脂肪組織線維化の分子機構はほとんど明らかでなかったが、本研究により、Mincle が主要な制御分子であることが示された。実際、Mincle 欠損マウスは、脂肪肝が軽減し、肝臓のインスリンシグナルが改善していた。肝臓に蓄積する脂肪のうち、脂肪組織に由来するものは約 2/3 を占める。本研究により、異所性脂肪蓄積の新たな分子機構が明らかになった(図②)。

#### D. 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の発症機構に関する検討(論文 1, 4)

NASH はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられ、予後良好の単純性脂肪肝と異なり、一定の割合で肝硬変や肝細胞癌に進行するため、その対策は喫緊の課題である。しかしながら、その発症機構は未だ不明の点が多く、特に、どのような症例が単純性脂肪肝から NASH へと進展するのか、現時点では全く予測できない。最近、我々は、中枢性の摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体(MC4R)を欠損するマウスに高脂肪食を負荷することにより、肥満やインスリン抵抗性を背景に、脂肪肝、NASH、肝細胞癌を経時的に、ほぼ 100%の確率で発症する新しい疾患モデルを確立した(*Am. J. Pathol.*, 2011)。本モデルの肝病理組織を解析していたところ、肥満の脂肪組織における CLS と類似の組織像(肝臓 CLS)を同定した。即ち、単純性脂肪肝から NASH を発症する過程において、代謝ストレスにより細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲み、肝臓 CLS を形成すると、ここを起点として、線維化が生じることを明らかにした。肝臓 CLS は NASH 発症に先行して形成されるため、肝臓 CLS

の詳細を明らかにすることにより、病態生理の解明や新規バイオマーカーの同定、新しい治療戦略の開発に資すると考えられる。最近、 $\omega$ -3 多価不飽和脂肪酸の EPA が MC4R 欠損マウスにおける肝臓 CLS 形成や肝線維化に対して予防および治療効果を示すことを見出し、MC4R 欠損マウスが既存薬や新規薬剤の薬効評価系として有用であることを明らかにした(図③)。

### 3. 今後の展開

本研究により、メタボリックシンドロームにおける「遊離脂肪酸の流れ」に即して、細胞内、細胞間、臓器間における炎症の慢性化機構を明らかにすることができた。今後の展開における最重要項目の1つは、内因性 Minclle リガンドの同定であり、代謝ストレスにより細胞死に陥った脂肪細胞に由来すると想定している。また、本さきがけ研究において、単純性脂肪肝から NASH に進行する過程においても、肝臓 CLS を起点とする同様の分子機構が関与する可能性を見出した。CLS は、実質細胞と間質細胞の相互作用の場であり、代謝性に誘導される組織リモデリングの駆動エンジンとして働くと考えられる。今後、脂肪組織 CLS と肝臓 CLS との共通性、あるいは組織特異性や病態特異性に注目して検討することにより、慢性炎症を標的とする新たなメタボリックシンドローム治療戦略の開発に貢献したい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

遊離脂肪酸に注目して、代謝ストレスにより誘導される炎症の慢性化機構を細胞内、細胞間、臓器間のレベルで明らかにし、メタボリックシンドロームの新たな病態の理解に繋がる研究成果を得た。本研究はほぼ予定通りに進捗しており、短期 NASH モデルの開発など新しい基盤技術の開発や臨床応用に向けた展開など、当初計画していなかった発展も認められる。このような研究成果により、学会や財団から賞を受けるとともに、名古屋大学において独立した研究室を主催するなど、研究者として大いなる飛躍に繋がった。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

本課題では、メタボリックシンドロームの病態基盤として脂肪組織や肝臓における慢性炎症性変化と全身への影響について解析し、新しい治療戦略の開発に向けた基盤技術を確立することを目標として、次のような研究成果をあげている。1) 飽和脂肪酸が TLR4 を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生を誘導する以外に、TLR4 非依存的に炎症性サイトカイン IL-6 産生を引き起こす機序としてストレス誘導性転写因子 ATF4 を介する経路を見だし発表した。2) 慢性脂肪組織炎症の結果として脂肪組織の線維化が起こり、さらに肝臓等における異所性脂肪蓄積を招来するが、その病態形成においてキーとなる分子として、脂肪組織炎症の核となる crown-like structure (CLS)を構成する炎症促進性 M1 マクロファージに局在し病原体センサーとして知られる Minclle を同定して発表した。脂肪組織局所において CLS を中心として間質の線維化が生じることを初めて明らかにした。3) 中枢性の摂食調節に重要なメラノコル

チン4型受容体 MC4R を欠損するマウスに高脂肪食を負荷することで、肥満やインスリン抵抗性を伴って脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、肝細胞癌を経時的に、ほぼ 100% の確率で発症する新たな疾患モデルを確立した。単純性脂肪肝から NASH を発症する過程の肝組織において肥満脂肪組織の CLS と類似する肝臓 CLS が形成され、ここを起点として線維化が生じることを明らかにした。また、このモデルの病態を  $\omega$ -3 多価不飽和脂肪酸の EPA 摂取が抑制することを見だし、本モデルが評価系として有用であることを見いだした。

基礎から臨床を見据えた広い視野で研究を継続し、メタボリックシンドロームの新たな病態の理解に資する研究成果を得た。短期 NASH モデルの開発の基盤技術の開発研究の発展も見られる。炎症の慢性化とメタボリックシンドロームの研究領域におけるリーダーの一人であり、本研究成果により独立を果たし、研究者としての飛躍につながっている。今後、益々の活躍に期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. K. Konuma, M. Itoh, \*T. Suganami, S. Kanai, N. Nakagawa, T. Sakai, H. Kawano, M. Hara, S. Kojima, Y. Izumi, Y. Ogawa. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using Melanocortin 4 receptor-deficient mice. *PLoS ONE* 2015; 10: e0121528.
2. M. Tanaka, K. Ikeda, \*T. Suganami, C. Komiya, K. Ochi, I. Shirakawa, M. Hamaguchi, S. Nishimura, I. Manabe, T. Matsuda, K. Kimura, H. Inoue, Y. Inagaki, S. Aoe, S. Yamasaki, \*Y. Ogawa. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat. Commun.* 2014; 5: 4982.
3. Y. Iwasaki, \*T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M. Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M. Nakai, Y. Miyamoto, \*Y. Ogawa. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes* 63: 2014; 152-161. (highlighted in commentary)
4. M. Itoh, H. Kato, \*T. Suganami, K. Konuma, Y. Marumoto, S. Terai, H. Sakugawa, S. Kanai, M. Hamaguchi, T. Fukaishi, S. Aoe, K. Akiyoshi, Y. Komohara, M. Takeya, I. Sakaida, \*Y. Ogawa. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS ONE* 2013; 8: e82163. (F1000Prime recommended)
5. N. Yamakawa, U. Ohto, S. Akashi-Takamura, K. Takahashi, SI. Saitoh, N. Tanimura, T. Suganami, Y. Ogawa, T. Shibata, T. Shimizu, \*K. Miyake. Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *Int. Immunol.* 2013; 25: 45-52.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 菅波孝祥、伊藤美智子、小川佳宏



発明の名称：非アルコール性脂肪肝炎モデル動物の製造方法  
出願人：東京医科歯科大学  
出願日：2015/6/8（非公開希望）  
出願番号：特願 2015-122913

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. T. Suganami, M. Tanaka, M. Itoh, Y. Ogawa  
“Role of parenchymal-stromal cell interaction in obesity-induced chronic inflammation”  
Symposium 2 “Obesity and Inflammation”  
The 8<sup>th</sup> Asia-Oceania Conference on Obesity 2015.10.2, Nagoya, Japan
2. T. Suganami, M. Tanaka, M. Itoh, Y. Ogawa  
“Obesity-induced adipose tissue remodeling and the metabolic syndrome”  
Symposium “Tissue remodeling and diseases”  
BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会 合同大会  
2015.12.1-4 神戸
3. T. Suganami, Y. Ogawa  
“Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation”  
International Symposium for the Study of Obesity 2014.10.26 Miyazaki
4. 菅波孝祥、小川佳宏  
「脂肪組織炎症と異所性脂肪蓄積、インスリン抵抗性」  
シンポジウム 臓器連関を介した糖代謝制御機構  
第 91 回日本生理学会 2014.3.16-18 鹿児島
5. 菅波孝祥、小川佳宏  
「脂肪酸代謝と炎症制御」  
シンポジウム 2 脂肪酸の病態栄養学  
第 42 回日本病態栄養学会年次学術集会 2014.1.11-12 大阪
6. 菅波孝祥、小川佳宏  
「メタボリックシンドロームにおける慢性炎症と異所性脂肪」  
シンポジウム 18 臓器間ネットワークによる病態制御  
第 87 回日本内分泌学会 2014.4.24-26 福岡
7. 菅波孝祥、小川佳宏  
「自然炎症の観点から捉えた慢性炎症と肥満症」  
シンポジウム 9 慢性炎症・細胞内ストレスと肥満症  
第 34 回日本肥満学会 2013.10.11-12 東京
8. T. Suganami, Y. Ogawa  
“Adipose tissue inflammation in obesity”  
シンポジウム 11 Molecular and cellular bases of chronic inflammation  
第 42 回日本免疫学会学術集会 2013.12.11-13 千葉

## 受賞

1. 平成 26 年度 第 7 回臨床薬理研究振興財団 研究大賞  
新しい疾患モデル動物を用いた非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の治療戦略の開発に関する研究
2. 平成 26 年度 第 18 回日本心血管内分泌学会 高峰譲吉研究奨励賞  
メタボリックシンドロームにおける脂肪組織炎症の分子機構と医学応用

## 著作物

### (日本語総説、著書等)

1. 菅波孝祥、小川佳宏  
肥満・メタボリックシンドローム  
実験医学 増刊号「先制医療へ向かう医学研究」2015; 33: 58-64.
2. 小川佳宏、菅波孝祥  
脂肪由来ホルモンと疾患  
朝倉内科学 2015; 1719-1720.
3. 菅波孝祥、小川佳宏  
Minclle と肥満関連疾患  
糖尿病学 2015 2015; 58-65.
4. 菅波孝祥、小川佳宏(企画)  
細胞工学「臓器代謝ネットワーク ～分子機構、破綻病態から臨床的意義まで～」  
2015; 33
5. 菅波孝祥、小川佳宏  
炎症疾患としての肥満/メタボリックシンドローム  
実験医学 増刊号「炎症と疾患の新概念」2015; 32: 201-207.

### (英語総説)

1. Y. Ogawa, T. Suganami, M. Tanaka, M. Itoh.  
Parenchymal-stromal cell interaction in metabolic diseases.  
*Inflamm. Regen.* 2015; 35: 167-171.
2. T. Suganami, M. Tanaka, Y. Ogawa.  
Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation.  
*Endocr. J.* 2012; 59: 849-857.

## プレスリリース

「肥満に伴う脂肪組織の線維化を招く鍵分子を発見  
～メタボリックシンドローム治療の新たな分子標的～」  
2014 年 9 月 19 日 (JST, 東京医科歯科大学)  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140919-2/>