

# 博士論文

肥満白色脂肪組織内への単球・マクロファージ浸潤量をモニターする脂肪細胞因子の単離，および食環境への応用研究

平成 28 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

眞田 洋平

# 博士論文

肥満白色脂肪組織内への単球・マクロファ  
ージ浸潤量をモニターする脂肪細胞因子の  
単離，および食環境への応用研究

平成 28 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物機能開発学専攻

眞田 洋平

## 目次

目次		p.1
略号		p.2
諸言		p.4
第1章	<u><i>in vivo</i>の肥満脂肪組織におけるマクロファージと脂肪細胞との相互作用の解明</u>	
	1-1 序論	p.15
	1-2 実験方法	p.17
	1-3 実験結果	p.27
	1-4 考察	p.29
	1-5 図表	p.33
第2章	<u>マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現増加する <i>Ikke</i>の単離</u>	
	2-1 序論	p.40
	2-2 実験方法	p.43
	2-3 実験結果	p.48
	2-4 考察	p.50
	2-5 図表	p.54
第3章	<u>マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現低下する <i>Rassf6</i>の単離</u>	
	3-1 序論	p.58
	3-2 実験方法	p.60
	3-3 実験結果	p.66
	3-4 考察	p.69
	3-5 図表	p.73
第4章	<u>白色脂肪組織の慢性炎症の可視化を目指したイメージングモデルマウスの作出</u>	
	4-1 序論	p.80
	4-2 実験方法	p.83
	4-3 実験結果	p.94
	4-4 考察	p.97
	4-5 図表	p.102
総合考察		p.110
引用文献		p.113
謝辞		p.127

## 略号

APS : ammonium peroxodisulfate

B6 : vitamin B6

BMI : Body Mass Index

BMP4 : bone morphogenetic protein 4

BPB : bromophenol blue

CEBP $\beta$  : CCAAT/enhancer binding protein beta

COX2 : cyclooxygenase 2

dH<sub>2</sub>O : distilled water

DTR : diphteria toxin receptor

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EMR1 : *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*

ERK : extracellular-signal regulated kinase

EtOH : ethanol

FFA : free faty acid

HFD : high fat diet

HMGA2 : *high mobility group A2*

IKK $\epsilon$  : Inhibitor of  $\kappa$ B kinase epsilon

Ig : Immunogloblin

IL-6 : *interleukin 6*

IL-1 $\beta$  : *interleukin 1 beta*

IL-1rn : *interleukin 1 receptor antagonist*

INF- $\gamma$  : Interferon gamma

IRF : interferon regulatory factor

JNK : c-jun N-terminal kinase

LPS : lipopolysaccharide

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MCP-1/CCL2 : *monocyte chemotactic protein-1*

MMP3 : *matrix metalloproteinase 3*

MSR1 : *macrophage scavenger receptor 1*

NFW : nuclease free water

NF- $\kappa$ B : nuclear factor- $\kappa$ B  
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis  
PAI- 1 : plasminogen activator inhibitor-1  
PBS : phosphate buffered saline  
PTX3 : *pentraxin 3*  
PPAR- $\gamma$  : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
RANTES/CCL5 : *chemokine (C-C motif) ligand 5*  
Rassf6 : *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6*  
Saa3 : *serum amyloid A3*  
Spp1 : *osteopontin*  
SVF : stromal vascular fraction  
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine  
Timp1: *tissue inhibitor metalloproteinase*  
Treg : regulatory T  
TLR4 : Toll-like receptor 4  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$   
TNFR : tumor necrosis factor receptor  
Tris : Tris(hydroxymethyl) aminomethane  
Tween 20 : polyoxyethylenesorbitan monolaurate

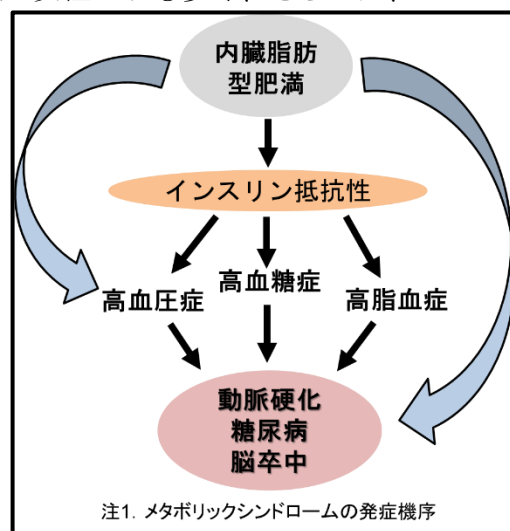
## 諸言

### メタボリックシンドロームについて

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型の肥満（肥満症）を背景にインスリン抵抗性、高脂血症、高血圧症などの生活習慣病が個人に集積して発症する状態と定義され、動脈硬化症などの重篤な血管疾患のリスクが上昇することから、正確な診断と効果的な治療が求められている。近年では、内臓脂肪型肥満がメタボリックシンドローム発症の最上流に位置する基礎疾患であることが示され、ウエスト周囲径の測定による内臓脂肪量の評価が、メタボリックシンドロームの診断時に実施されている。ウエスト周囲径が男性 85 cm、女性 90cm 以上である場合に肥満症とされ、その肥満症の存在に加えて、高脂血症、高血圧、空腹時高血糖（インスリン抵抗性診断）の 3 項目のうち、2 項目以上が存在すればメタボリックシンドロームと診断される。一方、3 項目のうち 1 項目のみが存在する場合は、メタボリックシンドロームの予備軍と診断されている。本邦でのメタボリックシンドロームの患者数は、その予備軍も含めると全成人の 30%を超えて推移しており、大きな社会問題となっている。特に、内臓脂肪型肥満を発症しやすい男性では、全年代の罹患者数が女性よりも多く、さらには、40-74 歳の年代では 2 人に 1 人以上がメタボリックシンドローム、またはその疑いがあることが 2013 年度国民・栄養調査より明らかにされた。特に、欧米諸国では、成人の肥満症の増加に加えて、小児肥満の罹患者数が著しく増加していることから、栄養学的観点からの肥満症の改善およびメタボリックシンドローム発症の予防が大きな課題とされており、その成因の解明が急がれている。

### アディポサイトカインの発見

白色脂肪組織（以下、脂肪組織）は、摂取した余剰なエネルギーを中性脂肪（tryglyceride）の形で脂肪細胞内に貯蔵し、飢餓時や運動時に全身にエネルギー供給するエネルギーの貯蔵庫として考えられていた。1993 年に Spiegelman らによって肥満時の脂肪組織では、腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor- $\alpha$  : TNF- $\alpha$ ）の発現量が顕著に増加し、血中に分泌されていることが明らかにされた[1,2]。TNF- $\alpha$  は、免疫細胞から放出される生理活性物質として、関節リウマチなどの炎症性疾患の発症に関与する炎症性サイトカインとして知られており[3]、肥満の脂肪組織から TNF- $\alpha$  が分泌されることが明らかにされて以来、脂肪組織から分泌される生理活性物質の存在が注目され始めた。TNF- $\alpha$  発見の翌年には、ポジショナルクローニング法を用いた遺伝性肥満 *ob/ob*



マウスの遺伝的解析によって、肥満の原因遺伝子として **Leptin** が同定され、さらに **Leptin** は脂肪細胞から合成、分泌されるタンパク質であることが見出された[4]。興味深いことに、**Leptin** は中枢神経系である脳視床下部に作用し、摂食行動をコントロールすることで中性脂肪の貯蔵量を脂肪細胞が自ら調節していることが明らかにされた[5-7]。そのため、これまで静的な臓器とみなされていた脂肪組織は、積極的に全身の代謝調節に関与する巨大な内分泌臓器として考えられるに至った。ヒト脂肪組織で発現する遺伝子の解析によっても、脂肪組織で発現する遺伝子の約 30%が分泌タンパク質をコードすることが明らかにされた[8,9]。以上のことから、脂肪組織は、ヒトにおいても多様な生理活性物質の分泌を通して生体調節に寄与する重要な生理機能を担っていると想定され、これら脂肪組織由来の分泌因子は **adipocytokine** と総称されている。現在までに多数の **adipocytokine** が報告されているが、それら個々の生理機能に関しては未だに未解明な面も多く、さらには現在までに発見されていない **adipocytokine** も存在していると考えられる。

### **悪玉 adipocytokine と善玉 adipocytokine**

ヒトやげっ歯類の肥満脂肪組織では **TNF- $\alpha$**  の発現量が増加するが、その発現量は肥満度 (**Body Mass Index : BMI**) と正に相関しており、さらには、高インスリン血症の指標となる血中インスリン濃度とも正に相関することから、**TNF- $\alpha$**  は肥満時に脂肪組織で異常に産生され、インスリン抵抗性の発症に深く関与していることが明らかになった[10]。実際に、遺伝性肥満モデルマウスに **TNF- $\alpha$**  の中和抗体を投与するとインスリン抵抗性が改善される実験結果が報告され、脂肪組織から分泌される **adipocytokine** が全身の代謝調節を担うことが示唆された。**TNF- $\alpha$**  同様に **interleukin-6 (IL-6)** の血中濃度も **BMI** と正の相関を示し、インスリン抵抗性の発症に関与する炎症性の **adipocytokine** として明らかにされた[10]。さらには、肥満脂肪組織から分泌される **plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)** は、血栓を融解するプラスミンの作用を阻害することで動脈硬化症の発症に関与することが示された[11]。また、**angiotensinogen** は、**angiotensin** 前駆体として **renin** や **angiotensin converting enzyme (ACE)** の作用によって **angiotensin II** へと変換され、血管を収縮することで血圧の上昇を引き起こすが、肥満脂肪組織では、**angiotensinogen** が過剰に産生されており、高血圧症や心血管疾患などの発症を誘発していることが明らかにされた[12,13]。このように、肥満脂肪組織において合成、分泌量が増加し、インスリン抵抗性や動脈硬化症など全身の代謝調節の破綻に関与する **adipocytokine** を悪玉 **adipocytokine** と総称し、現在までに多数の報告がなされている。

一方で、代謝改善を担う **adiponectin** も脂肪細胞で特異的に産生される分泌タンパク質である[14,15]。肥満発症に伴って **TNF- $\alpha$**  や **PAI-1** などの悪玉 **adipocytokine** の血中濃度は増加するのに対して、血中 **adiponectin** 濃度は **BMI** と逆相関を示し、特に 2 型

糖尿病を発症している患者では、BMI は同程度であっても血中 adiponectin 濃度は有意に低下しており、冠動脈疾患を合併すると血中濃度はさらに低下する [15,16]。adiponectin は血管傷害時には血管壁に集積し、血管内皮細胞への単球の接着抑制や、マクロファージの TNF- $\alpha$  分泌や泡沫化を抑制するなどの抗動脈硬化作用を有する [17]。さらには、肥満マウスへの adiponectin の投与実験によって、血中遊離脂肪酸 (Free fatty acids : FFAs) のエネルギーとしての利用が促進され、血中の FFAs 濃度は低下する。また、骨格筋に作用し、インスリン感受性を高めることで糖代謝の改善効果を示すことも報告されている [18]。このように脂肪組織から分泌される adiponectin は、TNF- $\alpha$  などの悪玉 adipocytokine とは性質が大きく異なり、代謝の改善効果を示すことから善玉 adipocytokine と定義されている。

このように、肥満を呈する脂肪組織は TNF- $\alpha$  や IL-6 などの悪玉 adipocytokine の産生が増加する一方で、adiponectin のような善玉 adipocytokine の産生の低下が認められる。adipocytokine は全身の代謝恒常性維持における重要な因子であり、肥満に伴う adipocytokine の産生機構の破綻が全身の代謝異常を引き起こし、メタボリックシンドロームの病態発症に深く関与するが、adipocytokine の産生機構が破綻するメカニズムについての詳細は明らかにされていない。

### 白色脂肪組織の組織リモデリング

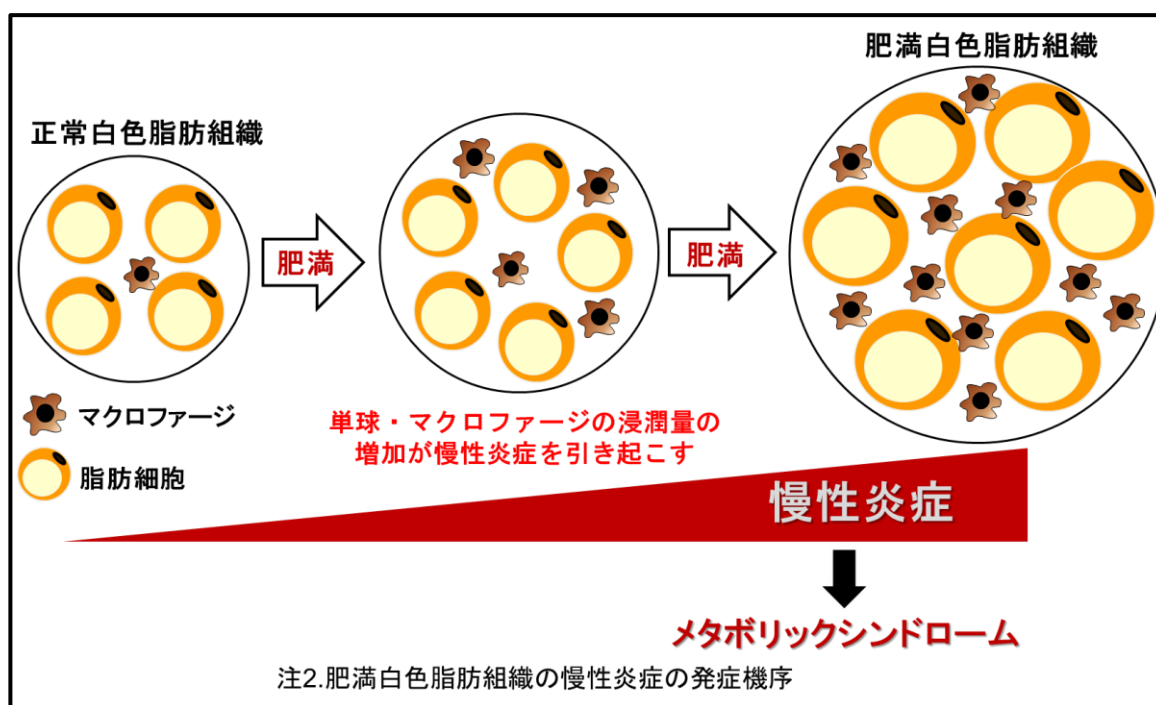
脂肪組織は、中性脂肪の貯蔵を担う成熟脂肪細胞のみならず、間葉系幹細胞を含む前駆脂肪細胞や、血管内皮細胞、さらには免疫反応を司るリンパ系細胞や単球・マクロファージなどで構成されており、その細胞構成は極めて多彩である。種々の生理活性物質を放出する脂肪組織は、その多彩な細胞構成によってサイトカインの正常な産生機構を維持していると考えられているが、肥満脂肪組織では、その細胞の構成が大きく変化することが明らかにされつつある。エネルギーの慢性的な過剰摂取に応答して、成熟脂肪細胞は多量の中性脂肪を取り込み肥大化する。一方で、その貯蔵容量には限界があり、過剰な中性脂肪の存在下では、成熟脂肪細胞は増加する。さらには、マクロファージや T 細胞、B 細胞などの免疫細胞が脂肪組織内へ浸潤し、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの異常な産生によって脂肪組織内の炎症が誘引され、血管新生が促進される。このように肥満脂肪組織では、細胞構成や細胞機能、組織形態がダイナミックに変化するが、その大規模な脂肪組織の構造変化は、動脈硬化巣に特徴的な「血管壁リモデリング」と類似しており、「脂肪組織リモデリング」として特徴づけられている [19-21]。肥満に伴う脂肪組織リモデリングは、脂肪組織の慢性炎症を惹起し、さらには全身の代謝不全を引き起こす極めて重要な病態であると考えられるが、組織リモデリングの詳細な分子メカニズムは不明であり、脂肪組織の慢性炎症の誘導機構は明らかにされていない。

### 肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤の病態的意義



近年では、リンパ球やマクロファージ、および顆粒球など脂肪組織を構成する免疫細胞の構成が肥満に伴いダイナミックに変化することが報告され[22–24]、特に、ヒトやマウスの肥満脂肪組織ではマクロファージ数は著しく増加する。2003年に Weisberg らは、組織免疫学的な解析によってマウスの肥満脂肪組織では、マクロファージのマーカーである F4/80 陽性細胞数が体重増加や脂肪細胞のサイズの増大と正に相関することを明らかにした[25]。さらに、生殖器周囲の内臓脂肪組織における転写産物の網羅的な解析によって、肥満脂肪組織で発現量が増加し、さらに BMI と正の相関を示す 1,304 個の転写産物が同定された。それらの転写産物において、BMI と最も高い相関が認められた 100 遺伝子の約 30%が colony stimulating factor 1 (CSF-1) 受容体や CD68 抗原のようなマクロファージに特徴的なタンパク質をコードする遺伝子であることが示され、肥満の進行に伴って脂肪組織へのマクロファージの浸潤量が増加する可能性が報告された[24,25]。肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加に関しては、骨髄由来前駆細胞である単球が脂肪組織に流入し、マクロファージへと分化することによって引き起こされる。特に、単球の遊走にはケモカインの一種である monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1/CCL2) が中心的役割を担うが[26,27]、脂肪組織における MCP-1 とその受容体である C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) の発現量は、肥満の発症によって増加することが示された[26,28]。さらに、*Mcp-1* または *Ccr2* 遺伝子の欠損マウス (MCP-1-KO または CCR2-KO) は、高脂肪食負荷により肥満を誘導させた際に、野生型と比較して脂肪組織内のマクロファージの浸潤量は有意に減少し、IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの発現量も低下した。さらには、耐糖能の改善やインスリン感受性が亢進するなど、ケモカインシグナルの遮断によってマクロファージの浸潤量を減少させることで、インスリン抵抗性の改善効果が示された[28,29]。また、高脂肪食負荷による食餌誘導性肥満マウスに CCR2 のアンタゴニストを投与することによっても、脂肪組織のマクロファージ蓄積量は減少し、インスリン感受性が亢進した[28]。Patsouris らは、脂肪組織へ浸潤するマクロファージに発現する CD11c 遺伝子のプロモーターの制御下において、ジフテリア毒素受容体 (diphtheria toxin receptor, DTR) を発現させる遺伝子改変マウスを作製し (CD11c-DTR マウス)、マクロファージの脂肪組織への浸潤による生理的意義についての解析を行なったところ、ジフテリア毒素投与によって肥満脂肪組織のマクロファージを欠損させることで、炎症性のサイトカインの発現低下が認められ、さらには全身の代謝不全が改善された[30]。以上の研究成果によって、肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤量の増加は、炎症性サイトカインの産生を

介した慢性炎症やインスリン抵抗性の発展に関与し、メタボリックシンドロームの発症において、重要な病態現象であることが示された。



### マクロファージの極性と慢性炎症

抹消血中を循環する単球は、炎症部位や感染部位へと遊走し、各組織においてマクロファージへと分化し、生理作用を発揮する[31,32]。一般的に、マクロファージは Interferon gamma (INF- $\gamma$ ) や lipopolysaccharide (LPS) などの Th1 サイトカインによる活性化によって誘導される M1 マクロファージ (活性型、炎症型) と interleukin-4 (IL-4) や interleukin-13 (IL-13) などの Th2 サイトカインによる活性化によって誘導される M2 マクロファージ (非活性型、抗炎症型) に分類される[33]。M1 マクロファージと M2 マクロファージは、異なる細胞表面マーカーを発現し、F4/80(+)CD11b(+)のマクロファージにおいて、CD11c(+)を M1 マクロファージ、一方で CD11c(-)を M2 マクロファージと分別されている[34]。一般に、M1 マクロファージは、炎症部位に集積して IL-6 や TNF- $\alpha$  を産生する炎症誘導型マクロファージであるのに対し、M2 マクロファージは損傷治癒や免疫調節に関わり、IL-10 や arginase などの抗炎症サイトカインを産生し、酸化ストレスや炎症性サイトカインの産生を抑制すると考えられている。

脂肪組織内の M1 マクロファージ数は、肥満の進行に伴って有意に増加することが示されている[35]。F4/80 抗体を用いた組織免疫染色によって脂肪組織内のマクロファージはネクローシスを起こした脂肪細胞を取り囲むように局在し冠状構造 (crown-like structure) を形成していることが明らかにされ、特に、M1 マクロファージが集積していた[36]。M1 マクロファージは、IL-6 や TNF- $\alpha$ 、interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) などの炎症

性サイトカインの産生を介して脂肪細胞に作用してインスリン感受性を低下させ、さらには炎症反応を惹起した結果、脂肪組織からの FFAs や炎症性サイトカインの異常分泌を引き起こすなど、**adipocytokine** の産生機構の破綻に関与していると考えられている [37,38]。このように、脂肪組織内の M1 マクロファージ数の増加は、インスリン抵抗性などの全身性の病態発症へ関与することが明らかにされた一方で、M1 マクロファージが増加するメカニズムは明らかにされていない。最近、脂肪細胞分化において重要な役割を担う核内受容体型転写因子である **peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$**  (**PPAR $\gamma$** ) がマクロファージにも発現しており、M2 マクロファージの極性化における重要なシグナル分子として同定された [39–41]。PPAR $\gamma$  欠損マウスは、正常食において M2 マクロファージの極性化が障害されており、インスリン抵抗性や耐糖能の悪化を示すとともに、炎症性サイトカインの発現量は増加し、高脂肪食負荷によってさらに悪化する。一方、PPAR $\gamma$  のリガンドである **thiazolidine** 作動薬を用いた PPAR $\gamma$  活性化は、炎症反応を抑制し、インスリン感受性を改善することが知られていたが、実際に脂肪組織内の M2 マクロファージ数を増加させ、M1/M2 バランスの不均衡を改善 (M2 への優位化) する可能性が示された [42]。さらに、マウスへの短期間の **thiazolidine** 投与によって脂肪組織における M2 マクロファージ数の増加を引き起こし、**interleukin-18** (**IL-18**) など炎症性サイトカインを減少させ、**interleukin-10** (**IL-10**) などの抗炎症性サイトカインの産生が亢進することが明らかにされた。同様に、インスリン感受性の改善効果を示す善玉 **adipocytokine** である **adiponectin** も M2 マクロファージの極性化を促進する生理機能を有することが報告された [43]。実際に **adiponectin** 欠損マウスでは、脂肪組織の M2 マクロファージ数が減少し、**TNF- $\alpha$** 、**IFN- $\gamma$** 、**IL-6** などの炎症性サイトカインの発現量は増加し、インスリン抵抗性を発症するが、これらは、**adiponectin** の投与により回復することが示された [43]。さらに近年では、正常な脂肪組織に常在している好酸球によって放出される **IL-4** などのサイトカインが M2 マクロファージの極性化に必須であることが示された [44]。肥満の進行に伴い脂肪組織では好酸球数が減少することが明らかになり、脂肪組織における好酸球の生理的役割が注目されている。実際に、好酸球または **IL-4** を欠損させたマウスの脂肪組織では M2 マクロファージ数が減少しており、高脂肪食負荷によってインスリン抵抗性が悪化するなど全身の代謝異常が示されている。これらの報告は、肥満に伴うマクロファージの脂肪組織内への浸潤量の増加に加え、M2 マクロファージ数に対して相対的に M1 マクロファージ数が増加することによる M1/M2 バランスの不均衡化が脂肪組織の慢性炎症を助長し、インスリン抵抗性などの病態発症に重要であることを示す知見であり、逆に M1/M2 バランスを調節することによってインスリン抵抗性の改善が可能であることを示すものである [38,41–45]。

### 肥満脂肪組織へ浸潤するリンパ球系細胞の役割

肥満脂肪組織への免疫細胞の浸潤は、脂肪組織の免疫細胞の構成を大きく変化させ、補体分子 C3a や TNF- $\alpha$  などのサイトカインを血液中に放出し、全身の免疫細胞の活性化、および炎症の惹起において重要な役割を持つ[27,46,47]。すなわち、脂肪組織は免疫細胞の構成によって正常な生理機能が維持される生体内最大の免疫器官であると捉えられる。2009年 Nishimura らによって、肥満に伴うマクロファージの脂肪組織内への浸潤に先行し、CD8(+)T 細胞が脂肪組織内に浸潤することが報告された[48]。T 細胞は、胸腺で発達、成熟し全身の獲得免疫反応において重要な役割を担っているが、細胞表面に CD4 を発現する helper T 細胞 (Th1, Th2) と CD8 を発現する細胞障害性 T 細胞が存在し、脂肪組織内にも常在している。ヒトやマウスの肥満個体の内臓脂肪組織では、T 細胞数が増加しており、特に、CD8(+)T 細胞数が顕著に増加している。ケモカインの一種である RANTES とその受容体 C-C chemokine receptor 5 (CCR5) は、T 細胞の遊走に関与することが知られているが、肥満の内臓脂肪組織における RANTES と CCR5 の発現は、正常食群と比較して有意に高く、CD8(+)T 細胞数やマクロファージ数と正に相関する[49]。一方で、マウスの内臓脂肪組織における RANTES の発現量は、血中 adiponectin 濃度と負に相関している。CD8 に対する中和抗体の投与または CD8 欠損マウスに高脂肪食を与えた肥満誘導試験では、脂肪組織内に浸潤するマクロファージ数は減少し、さらには、脂肪組織の炎症反応は抑制され、インスリン抵抗性を生じないことが示された[48]。さらに、T 細胞とマクロファージとの共存培養系を用いた *in vitro* 試験では、T 細胞はマクロファージの遊走と活性化を引き起こすことが示され、T 細胞はマクロファージの脂肪組織への遊走や活性化を通して脂肪組織の炎症反応を誘導する可能性が示された[48,49]。また、helper T 細胞ファミリーに属し、転写因子 FOXP3 を高発現する regulatory T 細胞 (Treg 細胞) は、組織の恒常性のために CD8(+)T 細胞の活性化などの炎症を伴う免疫反応を抑制的に調節している。Treg 細胞は、正常の内臓脂肪組織に豊富に存在するが、肥満の進行に伴い脂肪組織内の Treg 細胞数は減少し、さらに、Treg 細胞数はインスリン抵抗性や 2 型糖尿病の発症率と負の相関を示す[50,51]。肥満脂肪組織内の Treg 細胞数の減少と CD8(+)T 細胞数の浸潤量の増加はフィードバックループを形成し、病態の発症に関与している可能性が考えられている。T 細胞と同様に、リンパ球系細胞である B 細胞も高脂肪食負荷による肥満発症に伴って脂肪組織への浸潤量が増加することが報告された[52]。特に、B 細胞の欠損マウスを用いた高脂肪食負荷試験によって、野生型マウスと体重の差は認められなかったものの、空腹時血糖の低下およびインスリン抵抗性の改善が認められた。さらには、高脂肪食負荷を行ったマウスの B 細胞を B 細胞欠損マウスへ移植した際には、レシピエントマウスの耐糖能が悪化する一方で、正常マウスの B 細胞の移植では耐糖能の悪化は示さなかった[53]。一般に B 細胞は、骨髄で分化成熟し、血中へ放出された後、主に脾臓で抗原などの刺激に応答して免疫グロブリン (Immunoglobulin, Ig) を産生し、獲得免疫に寄与する。B 細胞は、高脂肪食負荷による肥満の誘導に応答して速やかに炎症性の

IgG $\gamma$ 2c 抗体 を過剰に産生する一方で、T 細胞の脂肪組織内への浸潤を促進し、T 細胞からの INF- $\gamma$  の産生を増強することで、協調的に M1 マクロファージを活性化し、脂肪組織内の慢性炎症に関与すると考えられる。

### 実験動物を用いた肥満の慢性炎症の評価法について

近年では、メタボリックシンドロームの治療薬として血糖値や血中コレステロールの低下薬、高血圧の改善薬などが用いられているが、それらの治療効果については特定の症状に対する薬理作用に限定されており、メタボリックシンドロームの病態の根本的な治療薬は存在しない。そのため、肥満脂肪組織の慢性炎症の抑制を目指した機能性食品の開発が進められているが、特に食環境の改善は肥満に伴う病態発症を効果的に予防する点でも極めて重要な方策である。動物実験による機能性評価が広く行われているが、それらの評価法は、実験終了時にマウスを屠殺し、エンドポイントによる生化学的な解析が主流となっている。一方で、病態の発症、進行時における生体内での変化や機能性食品などの機能性の評価については極めて限定的な情報しか得られない。その解決策としては、複数のエンドポイントを設定し、n 数を増やした動物実験を計画することが一般的であるが、数多くの実験動物が必要となるなど、用いられる実験動物数、また術式など動物実験での実施内容も動物愛護の観点から重大な社会問題となっている。一方、近年開発された *in vivo* イメージング技術は、生体内の微弱な化学発光や蛍光を体外から非侵襲的に観察可能な新しい動物実験の評価手法である[54–57]。極めて最近、癌細胞の転移研究などへの *in vivo* イメージング技術の利用が報告され、生きた個体の組織や細胞がリアルタイムにまた、継時的な観察が可能となった[58–62]。このように、イメージング技術による動物実験手法は、種々の疾患モデルへの応用がなされているが、現在までに肥満白色脂肪組織の慢性炎症を可視化するモデルマウスは存在しない。

### 脂肪組織の慢性炎症に対する vitamin B6 の効果

水溶性ビタミンの一種である vitamin B6 (以後 B6 と略す) は、1934 年に György らによってペラグラ様皮膚炎予防因子として発見され、生体内では主に pyridoxal phosphate (PLP) の形で存在し、アミノ酸代謝やホルモン作用の調節など種々の生理機能に関与する[63]。近年では、皮膚炎や口内炎に対する予防効果に加えて、関節リウマチ (rheumatoid arthritis) などの慢性炎症疾患に対して B6 が炎症反応を抑制する効果を示すことが明らかにされた[64,65]。本研究室においても、B6 の投与が LPS 刺激したマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞において、inducible nitric oxide synthase (iNOS) 、および cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現誘導を抑制することを見出した[66]。iNOS および COX-2 は、炎症性の転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化により発現が誘導される炎症性因子である。さらに、B6 の投与がヒト由来結腸癌細胞株 HT-29 細胞においても、TNF- $\alpha$  誘導性の NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することが報告され[67]、B6 は

NF- $\kappa$ B の活性化の抑制を介した炎症反応の抑制作用を有することが示されている。以前、分子栄養学研究室の末廣らによって B6 を 35 mg/kg の高容量で摂取させたマウスの脂肪組織において、B6 誘導体である PLP 濃度の有意な増加が示されことから、B6 を摂取させた際の肥満脂肪組織の慢性炎症に対する影響が検討された。興味深いことに、高 B6 摂取マウスの精巣周囲白色脂肪組織では、脂肪組織重量や脂肪細胞サイズに変化は認められないが、単球・マクロファージの浸潤が特異的に抑制される形質が示された (Table 1 参照)。高 B6 摂取マウスの脂肪組織では、マクロファージの浸潤が抑制された一方で、T 細胞や B 細胞の脂肪組織への浸潤量に変化は認められないことから、高 B6 摂取マウスはマクロファージの浸潤を選択的に抑制する動物モデルとして捉えることができる。そこで、B6 を高含量で摂取させたマウスを利用して、肥満脂肪組織におけるマクロファージの浸潤に関連した *in vivo* での病態遺伝子群を特異的に抽出できると考え、本研究に応用することとした。

## 本研究の目的および構成

本研究では、肥満白色脂肪組織における慢性炎症の成因の解明、および食環境での予防、改善を目指し、肥満脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用に関する *in vivo* における発現解析を通して、マクロファージの脂肪組織への浸潤に基づいた軽微な慢性炎症や全身の代謝異常の成因となる脂肪細胞由来の遺伝子の同定を目指した。さらに、マクロファージの浸潤量を反映する脂肪細胞由来の遺伝子を単離し、同遺伝子のプロモーター活性を利用した *in vivo* イメージング手法によって、肥満脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価する新たな動物モデルの構築を目指した。

- 第1章では、肥満マウスの白色脂肪組織において発現が増加する遺伝子群と B6 を負荷したマウスの白色脂肪組織において発現が抑制される遺伝子群との比較解析を行い、肥満脂肪組織の複雑な組織リモデリングの中から、マクロファージの浸潤に関連する候補遺伝子群を選抜し、脂肪細胞およびマクロファージにおけるそれら遺伝子群の詳細な発現解析を行うことで *in vivo* におけるマクロファージと脂肪細胞との相互作用の生理的意義についての理解を目指した。
- 第2章では、第1章において単離した候補遺伝子群の中で、特に、インスリン抵抗性などのメタボリックシンドロームの発症への関与が示唆されている *IκB kinase epsilon (Ikke)* に着目し、脂肪細胞における *Ikke* 遺伝子の発現解析を行い、肥満時の脂肪細胞における *Ikke* 発現量の増加の病態的意義を検討した。
- 第3章では、脂肪組織へのマクロファージの浸潤によって脂肪細胞で発現が逆に低下することで病態発症に関与する遺伝子群の単離に着手した。本章では、*in vivo* における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現が低下する因子として、*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6 (Rassf6)* を単離し、脂肪組織における生理的機能の解明に取り組んだ。
- 第4章では、脂肪組織における慢性炎症像を非侵襲的に可視化する新たな動物評価モデルの確立を目指し、脂肪組織へのマクロファージの浸潤量を反映する脂肪細胞由来の遺伝子の単離を試みた。本研究では、急性期炎症タンパク質の一つである *serum amyloid A3 (Saa3)* を候補因子として単離した。*Saa3* 遺伝子の promoter 領域に *luciferase* 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出し、実際に高脂肪食負荷によって肥満を誘導した際の *in vivo* イメージング解析を行うことで、脂肪組織の慢性炎症に対する新規評価系の構築を目指した。

Gene ID	Gene symbol	Gene description	Fold	P value
cytokines and chemokines				
NM_009987	Cx3cr1	chemokine (C-X3-C) receptor 1	0.46	0.000
NM_013652	CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	0.49	0.000
NM_009263	Spp1	secreted phosphoprotein 1	0.49	0.000
NM_011315	Saa3	serum amyloid A	0.49	0.000
NM_009915	Ccr2	chemokine (C-C motif) receptor 2	0.49	0.000
NM_009914	Ccr3	chemokine (C-C motif) receptor 3	0.51	0.000
NM_009917	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	0.53	0.000
NM_013654	CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 7	0.55	0.000
NM_021704	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	0.55	0.000
NM_013693	Tnf	tumor necrosis factor	0.55	0.000
NM_011333	MCP-1/CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	0.56	0.000
NM_008366	Il2	interleukin 2	0.58	0.002
NM_021274	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	0.58	0.000
NM_013653	RANTES/CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	0.59	0.000
NM_019418	Tnfsf14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	0.62	0.001
NM_011888	CCL19	chemokine (C-C motif) ligand 19	0.67	0.001
NM_011337	CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	0.73	0.002
recruited monocyte/macrophage				
NM_145976	Tifab	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain, family member B	0.42	0.000
NM_010208	Fgr	feline sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog	0.57	0.000
NM_178792	Sirpb1	signal-regulatory protein beta 1	0.58	0.000
NM_010387	H2-DMb1	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	0.61	0.001
NM_019467	Aif1	allograft inflammatory factor 1	0.63	0.002
NM_010330	Emb	embigin	0.68	0.007
NM_139138	Emr4	EGF-like module hormone receptor-like sequence 4	0.71	0.021
NM_030060	9130211I03Rik	RIKEN cDNA 9130211I03 gene	0.74	0.020
cell adhesion				
NM_010809	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	0.32	0.000
NM_008605	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	0.54	0.000
NM_021334	Itgax	integrin alpha X	0.57	0.000
NM_010576	Itga4	integrin alpha 4	0.58	0.000
NM_008607	Mmp13	matrix metalloproteinase 13	0.63	0.003
NM_008404	Itgb2	integrin beta 2	0.67	0.004
NM_008319	Icam5	intercellular adhesion molecule 5 (telencephalin)	0.68	0.007
NM_008401	Itgam	integrin alpha M	0.74	0.010
monocyte/macrophage marker				
NM_010821	Mpeg1	macrophage expressed gene 1	0.51	0.000
NM_031195	Msr1	macrophage scavenger receptor 1	0.56	0.000
NM_009853	Cd68	CD68 antigen	0.59	0.000
NM_010796	Mgl1	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1	0.62	0.000
NM_019388	Cd86	CD86 antigen	0.67	0.005
NM_010130	Emr1	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor 1	0.70	0.003
NM_030707	Msr2	macrophage scavenger receptor 2	0.71	0.018
inflammatory proteins				
NM_008987	Ptx3	pentraxin related gene	0.45	0.000

**Table 1. 食餌性 B6 の摂取量の増加により発現減少する遺伝子群**

1 mg/kg (低容量) または 35 mg/kg (高容量) の B6 を摂取させた際のマウス白色脂肪組織における遺伝子発現を、DNA microarray 法を用いて網羅的に解析を行った。低容量の B6 摂取群と比較して、高容量の B6 摂取群の脂肪組織ではマクロファージのマーカー分子などを含む 465 個の遺伝子の発現が低下していることを明らかにした。



## 第1章 *in vivo*の肥満脂肪組織におけるマクロファージと脂肪細胞との相互作用の解明

### 1-1. 序論

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満を背景にインスリン抵抗性を発症し、2型糖尿病や高血圧症、さらには動脈硬化症などの重篤な疾患群を続けて発症することから深刻な社会問題となっている。近年、肥満からこれらの疾患の根幹を成すインスリン抵抗性の発症に至る最も重要な引き金は、内臓脂肪組織の持続的、かつ軽微な慢性炎症であることが明らかになった。そのため、メタボリックシンドロームの効果的な予防、改善においては、脂肪組織の慢性炎症が発症する分子メカニズムの解明が求められている。特に、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加が報告されて以来、脂肪組織の慢性炎症の発症に関与する重要な病態シグナルとして脂肪組織内に浸潤した活性化マクロファージと脂肪細胞の相互作用が注目され、両細胞間の相互作用による病態的意義の解明が急がれている。

脂肪組織には、前駆脂肪細胞や免疫細胞からなる血管・間質系画分 (stromal vascular fraction: SVF) が存在する。SVFにおけるマクロファージ数の割合は、正常時は10%程度である一方で、肥満時には、実に、50%以上を占めることが明らかにされ、特に、肥満脂肪組織では炎症性のM1マクロファージが増加する[38]。脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用の生理的意義を解明するために、*in vitro*における両細胞の共存培養系が確立され、M1マクロファージから放出される代表的な炎症性メディエーターであるTNF- $\alpha$ などが脂肪細胞に作用し、主にnuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 経路を介して炎症性サイトカインや monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1/CCL2) などのケモカイン類の産生を増加させる。一方で、extracellular-signal regulated kinase (ERK) や c-jun N-terminal kinase (JNK) などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して脂肪分解を誘導し、脂肪組織内に過剰に放出された遊離脂肪酸 (特にパルミチン酸などの飽和脂肪酸) が toll-like receptor 4 (TLR4) を介してマクロファージを活性化することが示された[68,69]。実際に、TLR4の細胞内領域に点突然変異を有する C3H / HeJ マウスから単離した腹腔内マクロファージと 3T3-L1 脂肪細胞との共存培養を用いた解析がなされ、TLR4シグナルが遮断されたマクロファージは、遊離脂肪酸刺激による TLR4/NF- $\kappa$ B 経路の活性化が阻害され炎症性サイトカインの発現が有意に低下した[69]。このように、マクロファージは脂肪細胞から過剰に放出される遊離脂肪酸によって TLR4 を介して活性化されることが示され[69,70]、これらの両細胞の相互作用は病態的 paracrine loop として捉えられている[68,69]。また、マウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞とマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞との共存培養によって、脂肪細胞において TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインのみならず、CCL2などのケモカイン類の発現が顕著に増加することが

示され、さらには、ヒト由来脂肪細胞株 SGBS 細胞に対して、ヒト由来マクロファージ細胞株 THP-1 細胞の培養上清の添加は、容量依存的に MAPK や NF- $\kappa$ B 経路を活性化し、IL-1 $\beta$  や matrix metalloproteinases (MMPs) の産生の増加を引き起こした[71]。以上のように脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用によって炎症性サイトカインやケモカイン類の発現が上昇し、脂肪組織内の炎症反応を増強させることで、さらなるマクロファージの浸潤を促進する悪循環 (vicious cycle) が形成され、炎症の慢性化が引き起こされていると考えられている[68,69,72,73]。しかしながら、これらの報告例はいずれも *in vitro* における培養細胞を用いた解析方法に基づくものであり、生理的な環境下での両細胞の相互作用を観察する上では不十分である。一方、*in vivo* における肥満時の白色脂肪組織における複雑な組織リモデリングの中から、脂肪細胞とマクロファージとの相互作用に基づいた病態現象を特異的に抽出することは極めて困難であり、両者の相互作用の病態理解は進んでいない。このような背景の中、以前、分子栄養学研究室において、vitamin B6 (B6) を高含量で摂取させたマウスの脂肪組織では、脂肪細胞サイズや T 細胞、B 細胞などの浸潤には影響は認められないが、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤が選択的に抑制されることが見出された[74]。そこで、B6 を高含量で摂取させたマウスは、肥満脂肪組織におけるマクロファージの浸潤に関連した病態遺伝子群を特異的に抽出する動物モデルとして利用可能であると想定され、本研究において応用することとした。

本章では、遺伝性肥満モデルマウスの組織リモデリングが進行する白色脂肪組織において発現が有意に増加する遺伝子群と肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤が抑制されている B6 摂取マウスの白色脂肪組織において発現が低下した遺伝子群との比較解析を行い、肥満病態の進行に関与する遺伝子群から、脂肪組織へのマクロファージの浸潤に基づいた遺伝子群の選抜を試みた。さらには、*in vitro* における共存培養系を確立し、活性化マクロファージとの相互作用による脂肪細胞での形質の変化を解析し、先に選抜した脂肪組織へのマクロファージの浸潤に基づく遺伝子群の特徴づけを行い、*in vivo* における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の病態的な意義についての解明を目指した。

## 1-2. 研究材料、および実験手法

### 1-2-1. 一般試薬

一般試薬には主に nacalai tesque、Sigma の特級試薬を用いて行い、本論文においては一部の試薬名を簡略化して記載した。

### 1-2-2. polyacrylamide gel 電気泳動用の試薬の調製

#### 30% acrylamide の作製

29.0% acrylamide

1.0% N,N'-methylenebisacrylamide

上記の試薬をミリ Q 水で調製した後、0.45  $\mu\text{m}$  filter (Millipore 社製)で吸引濾過した。

#### 10×TBE の調製

0.89 M Tris

0.89 M boric acid

0.02 M EDTA

上記の終濃度となるように蒸留水で調製した。

#### polyacrylamide gel の作製

5.0% acrylamide

1×TBE

0.1% APS

0.01% TEMED

上記の終濃度となるようにミリ Q 水で調製した。

#### DNA 用 loading dye

50% glycerol

1 mM EDTA

0.2% BPB

上記の終濃度となるように dH<sub>2</sub>O で調製した。

### 1-2-3. 動物飼育

本研究で行う動物実験は、広島大学動物実験委員会において実験の手順、および方法について広島大学承認番号 C11-23 により承諾を得た後、関連する法令等を遵守しながら遂行している。

### db/db マウスの飼育

6 週齢の *db/db* (+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) 雄性マウス、およびコントロールとして *db/+* (+Dock7<sup>m</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) 雄性マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。馴化期間として、1 週間は脱イオン水と固形飼料を自由摂取させ、体重を記録し、実験に用いた。コントロール (*db/+*) マウスは、7 週齢以降も脱イオン水と固形飼料を自由摂取させ、*db/db* マウスは、実験食として、脂肪分 60% (カロリー比) を含む高脂肪飼料 HFD-60 (オリエンタル酵母社製) を 3 週間与えた。

### ob/ob マウスの飼育

14 週齢の *ob/ob* (Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>) 雄性マウス、およびコントロールとして C57BL/6J 雄性マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で、脱イオン水と固形飼料を自由摂取させ、飼育を行った。

### ICR 雄性マウスによる食事誘導性肥満試験

5 週齢の ICR 雄性マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。馴化期間として、1 週間は水と固形飼料を自由摂取させ、体重を記録し、実験に用いた。6 週齢以降は、実験食として高脂肪飼料 HFD-60 を 8 週間与え、コントロール (ND) マウスは AIN-93G (オリエンタル酵母社製) を自由摂取させた。

#### **1-2-4. 白色脂肪組織の抽出および total RNA の抽出**

絶食 5 時間後にマウスを屠殺し、精巣周囲の白色脂肪組織を抽出して脂肪組織重量を測定した。精巣周囲からもっとも遠位に位置する脂肪組織片 (約 0.3~0.5 g) をハサミで抽出し、QIAzol reagent (Qiagen 社製) 2 ml に加え、ホモジナイザーで完全に破碎し、30 分間室温にて静置した後、total RNA の調製まで -80°C で保存した。脂肪組織からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて行った。その手順を以下に記す。上記の -80°C に保存していたホモジナイズ溶液を解凍し、chloroform を 500 µl ずつ各サンプルに加え、15 秒間 vortex して良く混合した。3 分間室温にて静置し、遠心 (4,000 g、4°C、15 分間) した後、上清を新しい 1.5 ml 容チューブに回収した。回収した上清と等量の 70% ethanol (EtOH) を添加して転倒混合した後、カラムに添加し、遠心 (12,000 g、4°C、15 秒間) した。遠心後、フロースルー画分をデカントにて除去し、カラムに RW buffer を 700 µl ずつ添加して遠心 (12,000 g、4°C、15 秒間) した後、フロースルーを同様に除去した。続いて、あらかじめ EtOH を添加した RPE buffer を 500 µl ずつカラムに添加して遠心

(12,000 g、4°C、15 秒間) し、フロースルーを除去し、洗浄を行った。その後、再度遠心 (12,000 g、4°C、2 分間) し、カラム内の total RNA を乾燥させた。カラムを新しい 1.5 ml 容チューブにセットし、添付の RNase free water を 50  $\mu$ l ずつ滴下して遠心 (12,000 g、4°C、1 分間) を行い、total RNA を回収した。

### 1-2-5. DNA microarray 解析

#### 各群の total RNA の pool の調整

1-2-4 の項で回収した total RNA は、EtOH 沈殿を行った後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。EtOH 沈殿は、核酸溶液の 10 分の 1 容量の 3 M 酢酸 Na、2.5 倍容量の特級 EtOH を加え、転倒混合により全体を均一にした。以降の EtOH 沈殿の作業も全て同様に行った。 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存したサンプルを解凍後に遠心 (12,000 g、4°C、15 分間) し、上清を除去した後、70% EtOH で洗浄を行った。再度遠心し、上清を除去した後、減圧乾燥させた。RNase free 水を 50  $\mu$ l ずつ添加し、 $65^{\circ}\text{C}$  にて 3 分間熱処理して total RNA 溶液とした。nano drop 2000 (Thermo 社製) を用いて RNA 濃度を測定した後、2  $\mu$ g 相当の total RNA 溶液を群毎 (*db/db* 群、*db/+*群) に pool し、各群由来の total RNA 溶液とし DNA microarray 解析に供した。

#### cDNA の合成

各群の total RNA 溶液に T7 promoter primer 1  $\mu$ l と RNase-free water を加え、総量 7.7  $\mu$ l とし、 $65^{\circ}\text{C}$  で 10 分間熱処理し、氷上で 5 分間静置した。その後、1 サンプルあたり下記の cDNA 合成用の反応液を加え、穏やかに混合した。

5×First strand buffer	2.7 $\mu$ l
0.1 M DTT	1.3 $\mu$ l
10 mM dNTP mix	0.7 $\mu$ l
MMLV-RT	0.7 $\mu$ l
RNase OUT	0.3 $\mu$ l

反応液を  $40^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベートし、 $65^{\circ}\text{C}$  で 15 分間熱処理して反応を停止させた後、氷上で 5 分間静置し cDNA を合成した。

#### cRNA 標識プローブの合成

合成した cDNA 5.7  $\mu$ l と下記の cRNA 標識プローブ合成用の反応液を混合した。

RNase free distilled water (Invitrogen 社製)	10.2 $\mu$ l
4×Transcription buffer	13.33 $\mu$ l
0.1 M DTT	4.0 $\mu$ l
NTP mix.	5.33 $\mu$ l
50% PEG	4.27 $\mu$ l

RNase OUT	0.33 $\mu$ l
Inorganic pyrophosphatase	0.40 $\mu$ l
T7 RNA polymerase	0.53 $\mu$ l

サンプルを加えたチューブを遮光して、さらに Cyanine3-CTP、あるいは Cyanine5-CTP を 1 サンプルあたり 1.6  $\mu$ l ずつ加え、穏やかに混合した後、40°C で 2 時間、遮光下でインキュベートした。

### **Cyanine3 あるいは Cyanine5 標識 cRNA の精製**

標識した cRNA は、RNeasy Mini kit (Qiagen 社製) を用いて、以下の手順に従って精製を行った。40.3  $\mu$ l の nuclease-free water (NFW) を標識した cRNA に加え、350  $\mu$ l の RLT buffer を添加した。さらには、250  $\mu$ l の EtOH を加え、ピペッティングによって静かに混合した後、全量を RNeasy mini カラムに添加した。カラムを 13,000 g で 30 秒間遠心を行い、フロースルー画分を除去した。その後、あらかじめ EtOH を加えて調整した RPE buffer を 500  $\mu$ l カラムに添加し、13,000 g で 30 秒間遠心して洗浄を行い、フロースルー画分を除去した。再度 RPE buffer を 500  $\mu$ l 加え、同様に洗浄を行った。さらに、カラムを 13,000 g で 1 分間遠心を行い、乾燥させた。新しいチューブにカラムを移し、30  $\mu$ l の NFW をカラム中央に適下し、13,000 g で 1 分間遠心して cRNA 溶液を精製した。精製後、nano drop 2000 (Thermo 社製) を使用して、cRNA の収量および Cy3-CTP あるいは Cy5-CTP の取り込み率を算出し、プロトコール推奨の基準を満たしていることを確認した。

### **ハイブリダイゼーションおよびアレイ解析**

825 ng 相当の Cyanine3、および Cyanine5 ラベル標識した cRNA 溶液をハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーションはオリゴ DNA マイクロアレイハイブリダイゼーションプロトコール (Agilent Technologies 社製) に従い、4×44k マルチパックフォーマットの Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent Technologies 社製) を用いて行った。ハイブリダイゼーション後、マイクロアレイを Agilent Gene Expression Wash Buffer1、Agilent Gene Expression Wash Buffer2、アセトニトリル溶液によって洗浄を行った。洗浄の工程は、洗浄プロトコールに厳密にしたがって実施した。洗浄後のマイクロアレイを SureScan マイクロアレイスキャナー (Agilent technologies 社製) にセットし、アレイ上の蛍光のスキャンを行った。

## **1-2-6. 酵素分散法による成熟脂肪細胞と SVF の分離**

### **collagenase type I 溶液の調製**

collagenase type I (worthington 社製) を PBS(-) で 1 mg/ml となるように調製し、

collagenase type I 溶液として使用した。

### **成熟脂肪細胞画分と SVF の分離**

*ob/ob* マウスの脂肪組織 0.3 g を 60 mm / dish に入れ、ハサミと手術用メスで細切後 50 ml 容チューブに入れ、あらかじめ調製した 1 mg/ml の collagenase Type I 溶液 15 ml に浸した後、37°C で 30 分間振とうした (stroke 88/min)。その後、cell strainer 100 µm (BD Falcon 社製) でフィルトレートし、不純物を除去した後、遠心 (300 g、5 分間) を行った。上清の細胞層を 100 µl 回収し、成熟脂肪細胞画分とした。その後上清を除去し、1×PBS を 100 µl 加えて懸濁した後、再度遠心 (300 g、5 分間) し、その沈殿物を間質・血管系画分 (stromal vascular fraction : SVF) とした。QIAzol Reagent を成熟脂肪細胞画分には 500 µl、SVF には 900 µl 加えて 30 分室温にて静置した後、total RNA の調製まで -80°C で保存した。

### **total RNA の調製**

分離した成熟脂肪細胞と SVF からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて行った。成熟脂肪細胞層には、chloroform を 200 µl、SVF には 100 µl 加え、1-2-4 の項と同様に total RNA の調製を行った。nano drop 2000 を用いて total RNA の濃度を測定し、成熟脂肪細胞層 (80 ng 相当)、SVF (50 ng 相当) の total RNA 溶液を用いて、1-2-7 の項に示す逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

### **1-2-7. RT-PCR 解析**

#### **逆転写反応による cDNA の合成**

ReverTra Ace RT (TOYOBO 社製) を用いて cDNA 合成を行った。500 ng 相当の total RNA と RNase free distilled water を混合し、10.5 µl に合わせた。random primer (3 µg/µl, invitrogen) 2 µl を加え、65°C で 5 分間熱処理し、氷上で 1 分間静置した。スピンドウンした後、1 サンプルあたり以下の反応液を加え、穏やかにピペッティングを行い均一にした。

ReverTra Ace RT (TOYOBO 社製)	1.0 µl
5×First-Strand buffer (TOYOBO 社製)	4 µl
10 mM dNTP mix (TOYOBO 社製)	2 µl
Recombinant RNase inhibitor (Takara Bio 社製)	0.5 µl

30°C で 10 分間インキュベートした後、42°C で 60 分間インキュベートし、95°C で 10 分間熱処理を行い、反応を停止させた。1 サンプルにつき 100 µl の dH<sub>2</sub>O を加え、cDNA 溶液とした。

合成した cDNA を用いて Ex-Taq DNA polymerase (Takara Bio 社製)、Go-Taq DNA

polymerase (Promega 社製)、あるいは Quick-Taq DNA polymerase (Takara Bio 社製) による PCR 反応を行った。Ex-Taq DNA polymerase を用いた PCR 反応終了後には、増幅産物 10  $\mu$ l に DNA loading dye を 2.5  $\mu$ l を混合した後、5% PAGE で電気泳動を行った。電気泳動は 1×TBE の泳動 buffer を用い、200V の定電圧で 50 分間の条件で行った。電気泳動終了後、gel を ethidium bromide 溶液に浸し、UV 照射により増幅 DNA のバンドのパターンを確認した。

以下に PCR 反応の手順を記す。

PCR 反応は 1 サンプルあたり以下の反応スケールでサンプルを調製した。

#### Ex-Taq DNA polymerase (25 $\mu$ l scale)

nuclease free water	16.80 $\mu$ l
10×PCR buffer	2.0 $\mu$ l
dNTP mix	2.0 $\mu$ l
Ex-Taq DNA polymerase	0.2 $\mu$ l
sense primer	1.0 $\mu$ l
antisense primer	1.0 $\mu$ l
cDNA	2.0 $\mu$ l

#### Go-Taq Green master mix (20 $\mu$ l scale)

Green master mix	10.0 $\mu$ l
nuclease free water	8.0 $\mu$ l
cDNA	1.0 $\mu$ l
sense primer	0.5 $\mu$ l
antisense primer	0.5 $\mu$ l

#### Quick-Taq master mix (20 $\mu$ l scale)

Quick-Taq master mix	10.0 $\mu$ l
nuclease free water	8.0 $\mu$ l
cDNA	1.0 $\mu$ l
sense primer	0.5 $\mu$ l
antisense primer	0.5 $\mu$ l

PCR 用 8 連チューブに上記の反応液を均一となるように正確に加え、スピンドウンを行った。95°C で 2 分間熱処理し、95°C 40 秒間→58°C 40 秒間→72°C 1 分間の条件下で、計 30 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させ



た。

本研究で使用した合成 primer は全て 100  $\mu$ M で使用した。下記に使用した合成 primer を記す。

mouse *Tnf- $\alpha$*

sense primer 5'-CCGATGGGTTGTACCTTGTC-3'

antisense primer 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'

mouse *Mcp-1/ccl2*

sense primer 5'-GGTCCCTGTCATGCTTCTGG-3'

antisense primer 5'-CCTTCTTGGGGTCAGCACAG-3'

mouse *Rantes/ccl5*

sense primer 5'-CCCTCACCATCATCCTCACT-3'

antisense primer 5'-AGCAAGCAATGACAGGGAAG-3'

mouse *Msr1*

sense primer 5'-TCAAAC TCAAAGCCGACCT-3'

antisense primer 5'-ACGTGCGCTTGTTCCTTCTTT-3'

mouse *Emr1*

sense primer 5'-ATTGTGGAAGCATCCGAGAC-3'

antisense primer 5'-GTAGGAATCCCGCAATGATG-3'

mouse *Mpeg1*

sense primer 5'-GCTTGCCCTCTGCATTTCTTC-3'

antisense primer 5'-TCTTCTGCTCCAGGTTTTGG-3'

mouse *Ptx3*

sense primer 5'-TGGGTGGAAAGGAGAACAAG-3'

antisense primer 5'-CCGATCCCAGATATTGAAGC-3'

mouse *Mmp3*

sense primer 5'-TGGAGATGCTCACTTTGACG-3'

antisense primer 5'-AGAGCTGCACATTGGTGATG-3'

### mouse *Saa3*

sense primer                    5'-TTGATCCTGGGAGTTGACAG-3'  
antisense primer                5'-CACTCATTGGCAAACCTGGTC-3'

### mouse *adiponectin*

sense primer                    5'-TGGAGATGCTCACTTTGACG-3'  
antisense primer                5'-AGAGCTGCACATTGGTGATG-3'

### $\beta$ -actin (mouse, human)

sense primer                    5'-TTGGGTATGGAATCCTGTGGCATC-3'  
antisense primer                5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'

### mouse *L-19*

sense primer                    5'-GGCATAGGGAAGAGGAAGG-3'  
antisense primer                5'-GGATGTGCTCCATGAGGATGC-3'

### real-time PCR による発現解析

real-time PCR 反応には THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社製) を使用した。primer と鋳型 cDNA は上記の項と同様のものを使用した。primer は sense、antisense の両方を含む、終濃度 5  $\mu$ M の primer set (5  $\mu$ M primer set) を使用した。

nuclease free water	6.60 $\mu$ l
5 $\mu$ M primer set	2.00 $\mu$ l
ROX	0.40 $\mu$ l
THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix	10.0 $\mu$ l
cDNA	1.00 $\mu$ l

上記組成の反応溶液を丁寧に混合し、鋳型 cDNA を反応溶液に加え、ピペッティングは行わずスピンドウンを行い、気泡が混入していないことを確認した。StepOne リアルタイム PCR システム (Applied biosystems 社製) にセットし、95°C 2 分間の熱変性後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとし 40 サイクル行った。後に、65°C から 90°C までの melting curve を作成した。

### 1-2-8. 細胞の培養、および共存培養法

#### 3T3-L1 細胞の継代培養および分化誘導

##### **【DMEM 培地の調整】**

10% fetal bovine serum (FBS) (BIOLOGICAL INDUSTRIES 社製)  
100  $\mu$ g/ml streptomycin (Invitrogen 社製)

100 units/ml penicillin (Invitrogen 社製)

上記の最終濃度なるように Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma 社製) にそれぞれ溶解し、DMEM 培地とした。

#### 【PBS 溶液の調整】

PBS (-)粉末 (COSMO BIO 社製) を、1 L の dH<sub>2</sub>O に溶解させ、オートクレーブ滅菌したものを培養細胞用 PBS (-)として使用した。

#### 【分化誘導培地 (MDI) 】

0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma 社製)

1 μM dexamethasone (Sigma 社製)

5 μg/ml bovine insulin (Sigma 社製)

上記の最終濃度となるように DMEM 培地に試薬を調整した。

#### 3T3-L1 細胞の継代培養および分化誘導

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞の培養は、DMEM 培地を基本培地として 100 mm × 20 mm cell culture dish (CORNING 社製) に  $1.5 \times 10^5$  cells/dish の条件で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。細胞は dish の 8 割に達した際に 0.25 %-trypsin-EDTA 溶液 (nacalai tesque 社製) を用いて継代した。

脂肪細胞への分化誘導は、以下の方法で行った。あらかじめ、35 mm × 10 mm cell culture dish (CORNING 社製) に細胞を  $4.0 \times 10^5$  cells/dish の条件で播種し、培養を開始した。約 2 日後、細胞密度がコンフルエントに達した後、DMEM 培地に分化誘導因子を加えた MDI と交換した。この交換日を分化誘導 0 日目 (day0) とした。その後は 2 日おきに 5 μg/ml bovine insulin (Sigma 社製) を含む DMEM 培地と交換した。以降の脂肪細胞の分化誘導も同様の方法で行った。これら培養細胞の実験はすべてクリーンベンチ内で無菌的に行った。

#### 培養細胞からの total RNA の調製、および RT-PCR 解析

未分化あるいは脂肪細胞分化させた 3T3-L1 細胞の培地を取り除き、QIAZOL reagent を 500 μl ずつシャーレに加え、セルスクレーパーで細胞をシャーレから剥がした後、1.5 ml 容チューブに溶液を回収した。回収した Qiazol 溶液に chloroform を 200 μl ずつ加え、15 秒間激しく vortex し、3 分間静置した。その後遠心 (12,000 g、4°C、10 分間) を行い、上清を新しい 1.5 ml 容チューブに回収した。1-2-4 の項で記した組織からの total RNA の抽出と同様に、RNeasy Lipid Tissue Mini kit を用いて total RNA の抽出を行った。回収した total RNA 濃度を nano drop 2000 を用いて測定し、1 μg 相当の total RNA を用いて 1-2-7 の項と同様に逆転写反応を行い、cDNA を作製し

た。作製した cDNA を用いて、1-2-7 の項に記した RT-PCR あるいは real-time PCR 解析の方法と同様に、PCR 解析を実施した。

#### **RAW264.7 細胞(RAW 細胞)の継代培養、および lipopolysaccharide (LPS) 刺激**

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW 細胞の培養は、100 mm×20 mm cell culture dish に DMEM 培地を用いて  $1.0 \times 10^6$  cells/dish の条件で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で行った。細胞は dish の 8~9 割に達した際にセルスクレーパーを用いて回収し継代した。

RAW 細胞への LPS 刺激は、以下の方法で行った。あらかじめ、60 mm×20 mm cell culture dish (CORNING 社製) に RAW 細胞を  $1.0 \times 10^6$  cells の条件で播種し、24 時間培養を行った。最終濃度 1 µg/ml となるように LPS (Sigma 社製) を添加した。この添加した時間を LPS 刺激 0 時間とした。LPS 刺激 24 時間後の RAW 細胞の培地を除き、Qiazol reagent 500 µl を加え、1-2-4 の項で記した組織からの total RNA の抽出と同様に、RNeasy Lipid Tissue Mini kit を用いて total RNA の抽出をい、1-2-7 の項と同様に逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

#### **Transwell system を用いた共存培養**

Transwell は、Costar 社製のクリアタイプを使用した。12 well cell culture plate (Costar 社製) に 3T3-L1 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/dish の条件で播種し、定法に従って成熟脂肪細胞へ分化させた。分化 8 日目に、transwell を設置し、RAW 細胞を  $1.0 \times 10^6$  cells/transwell の条件で播種し、24 時間培養後に終濃度 1 µg/ml の LPS を添加し、24 時間または 48 時間共存培養させた。また、対照群として RAW 細胞を播種せず、LPS を 1 µg/ml の条件で添加した。

### 1-3. 実験結果

#### 1-3-1. 遺伝性肥満 *db/db* マウスの遺伝子発現解析—単球・マクロファージの浸潤に関連して発現上昇する因子群の単離

遺伝性肥満病態モデル (*db/db*) マウス、およびコントロール (*db/+*) マウスの精巣周囲白色脂肪組織における 2 群間の遺伝子発現変動を DNA microarray 法を用いて解析を行った。*db/db* マウスは、レプチン受容体 (leptin receptor: OB-R) が遺伝的に変異している肥満モデルマウスであり、摂食量をコントロールする Leptin シグナルが破綻していることから自然発症的に重篤な肥満を呈する。一方で、肥満を呈さないヘテロ変異マウス (*db/+*) を対照群として実験に供した。DNA microarray 法は、生物学的に異なる 2 群間における遺伝子発現の差異を相対的に比較する方法であり、2 群間で発現変動する遺伝子を網羅的に解析することが可能である。今回は 1 枚のスライドガラスの片面に、4 万 1 千個以上のマウス遺伝子と転写産物由来の 60-mer オリゴヌクレオチド配列がスポットされたアレイが計 4 枚載っている 4×44k フォーマット (Agilent Technologies 社製) を使用した。また、蛍光色素の取り込み効率、およびハイブリダイゼーション効率の差異が原因となる誤差や DNA microarray 解析には避けられない偽陽性を排除するため、蛍光色素とサンプルの組み合わせを入れ替え、1 サンプルにつき 2 通りのハイブリダイゼーションを行う Dye Swap 法を利用することで真の候補遺伝子の同定を試みた。DNA microarray 法による解析結果においては、cRNA 標識プローブに適正なシグナル像を示した遺伝子群を選択するため、pValueLogRatio 値が 0.05 以下であるものを陽性シグナルとして選択した。その結果、野生型 *db/+* マウスと比較して *db/db* マウスの脂肪組織において mRNA 発現が有意に上昇する 1,810 個の遺伝子を単離した。一方、末廣は 1 mg/kg の B6 摂取群と比較して 35 mg/kg の B6 摂取群の脂肪組織においてマクロファージの浸潤量が減少しており、その際の白色脂肪組織の mRNA 発現を解析した結果、465 個の発現量が低下することを明らかにしている[75]。そこで、両遺伝子発現の解析結果を比較分析し、*db/db* マウスの肥満の進行に伴い発現量が有意に増加する遺伝子群の中から、マクロファージの浸潤に関連する遺伝子群の選抜を行った (Fig. 1)。その結果、262 個の遺伝子群が単離され、この中には、マクロファージのマーカー遺伝子や *ccl2* などのケモカイン遺伝子が含まれていた (Table 2)。

#### 1-3-2. 単球・マクロファージの浸潤に関連して発現上昇する因子群として選抜した候補遺伝子の発現解析

先に述べたように、DNA microarray 法では偽陽性が出現することから、各マウス個体より total RNA を調製し、マウス白色脂肪組織内での発現変動について個体別に解析を試みた。今回選抜を行った各候補遺伝子については特異的 primer を設計し、*db/db* および *db/+* マウス (各群 n=3) の各個体の脂肪組織由来の total RNA を逆転写反応に供し、cDNA を調製した。*db/db* マウスの白色脂肪組織の遺伝子発現と B6 摂取マウスの遺伝子発現の比較解析によって単離された 262 個の中から、マクロファージのマーカー遺伝子やケモカイン類、さらに

は炎症性のサイトカインなど候補遺伝子の RT-PCR 解析を行った。*Tnf- $\alpha$* 、*Mcp-1/ccl2*、*Spp1*、*Emr1*、*Msr1*、*Mmp3*、および *Ptx3* の遺伝子群は *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現量が著しく増加していた (**Fig.2**)。さらに、real-time PCR 法による解析において、野生型 *db/+* マウスと比較して *db/db* マウスの脂肪組織において *Mmp3*、*Ptx3* の mRNA 発現量は、それぞれ 3.0 倍および 2.2 倍有意に高まることを示した (**Fig.3A, B**)。また、B6 摂取マウスの脂肪組織の cDNA (各群 n=12) を用いて real-time PCR 解析を行い、*Mmp3*、*Ptx3* の発現量は B6 摂取量の増加によってそれぞれ 60% または 50% まで有意に低下することを示した (**Fig.3C, D**)。

### 1-3-3. マクロファージ RAW 細胞と脂肪細胞株 3T3-L1 細胞との共存培養による候補遺伝子の発現解析

RAW 細胞と 3T3-L1 細胞との共存培養系を transwell system を用いて構築し、TLR4 のリガンドである LPS によって RAW 細胞を活性化させ、*in vitro* での両細胞間の相互作用を解析した (**Fig.4**)。RAW 細胞と共存培養をさせた際の 3T3-L1 脂肪細胞由来の cDNA を個別に調製し、単離した候補因子群の RT-PCR による解析を行った結果、*Mmp3*、*Ptx3*、*Mcp-1*、*Cxcl10*、*Ccl7*、*Rantes/ccl5* の発現量は、LPS 刺激により活性化した RAW 細胞との共存培養によって 3T3-L1 細胞において著しく発現量が増加した (**Fig.5A**)。さらに、real-time PCR による定量解析によって *Mmp3*、*Ptx3* の発現量は、対照群と比較して活性化した RAW 細胞と共存培養させた 3T3-L1 細胞においてそれぞれ 250 倍および 80 倍有意に増加していた (**Fig.5B, C**)。

### 1-3-4. 肥満脂肪組織においてマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞で発現増加する *Ptx3*、*Mmp3* の単離

*Ptx3*、および *Mmp3* の白色脂肪組織での発現量を real-time PCR 法を用いて定量化し、一方で、F4/80 抗体を用いた同組織の組織免疫染色によるマクロファージの浸潤数を数値化した。両指標における相関の有無を pearson の積率相関分析によって解析し、*Ptx3*、および *Mmp3* の mRNA 発現量とマクロファージ浸潤量とは正に相関することを示した (**Fig.6A, B**)。分化または未分化の 3T3-L1 細胞、および酵素分散法による分画を行った成熟脂肪細胞画分 (adipocyte)、および SVF の各 cDNA を用いた RT-PCR 解析を行い、3T3-L1 細胞、および成熟脂肪細胞においてのみ *Ptx3* mRNA の発現は確認されたが、*Mmp3* の発現はマクロファージ細胞株 RAW 細胞や SVF においても mRNA 発現が認められた (**Fig. 6C, D**)。以上の結果は、*Ptx3* はマクロファージの浸潤量の増加に伴って、脂肪細胞で発現が誘導した可能性が示唆される一方で、*Mmp3* は、脂肪細胞および浸潤したマクロファージの両細胞において発現している可能性が示された。

#### 1-4. 考察

メタボリックシンドローム発症の根幹であるインスリン抵抗性を発症する成因として、肥満脂肪組織の持続的かつ軽微な慢性炎症が注目されている[76]。特に、ヒトやマウスの肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加が報告されて以来、マクロファージと脂肪細胞との相互作用が脂肪組織の慢性炎症の発症において重要な病態シグナルであると捉えられている[24,25]。一方、肥満脂肪組織において進行する複雑な組織リモデリングの中から、マクロファージと脂肪細胞との相互作用を特異的に解析することは困難であり、両者の相互作用の理解は進んでいない。本章では、*in vivo*の肥満脂肪組織において肥満の進行に伴い発現量が増加する遺伝子群の中から、マクロファージの浸潤に関連する候補遺伝子群を選抜し、さらには共存培養を用いたマクロファージと脂肪細胞との相互作用の解析を通して、それらの遺伝子群の詳細な発現解析を行うことで両者の相互作用による病態発症の理解を試みた。

遺伝性肥満 *db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織の遺伝子発現変動を DNA microarray 法を用いて網羅的に解析し、肥満の進行に伴って発現上昇する 1,810 個の遺伝子群を単離した。これら遺伝子群には、従来から知られている TNF- $\alpha$  などの肥満病態に関与する因子群が含まれていた。次に、マクロファージの浸潤を選択的に抑制する動物モデルである高 B6 摂取マウスの白色脂肪組織において発現量が有意に低下した 465 個の遺伝子群との重ね合わせを行うことで 262 個の因子群を抽出した。これら因子群には、*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (Emr1)*、*macrophage scavenger receptor 1 (Msrl)* などのマクロファージマーカー遺伝子や、*monocyte chemotactic protein-1 (Mcp-1/ccl2)*、*osteopontin (Spp1)*、*chemokine (C-C motif) ligand 5 (Rantes/ccl5)* などの単球・マクロファージの遊走に関わるケモカイン類が多く含まれていることが明らかになった。そこで両遺伝子群の重ね合わせ解析は、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連する遺伝子が効率よく抽出されていると考えられ、B6 摂取マウスを肥満時のマクロファージの浸潤に関連した病態遺伝子群を抽出するモデルとして利用したことは妥当な手段であると考えられた。

さらに、transwell system を用いた *in vitro* 培養系において RAW 細胞と 3T3-L1 細胞の共存培養系を確立し (Fig.4)、*in vivo* において選抜した 262 個の因子群が両細胞間の相互作用によって発現変動するのか解析を試みた。その結果、262 個の因子群の中で、LPS 刺激を行っていない RAW 細胞との共存培養群と比較し、LPS 刺激により活性化された RAW 細胞と共存培養を行った脂肪細胞において発現量が増加する 39 個の因子群を選抜し、その中には *matrix metalloproteinase 3 (Mmp3)* や *pentraxin 3 (Ptx3)* などの炎症性サイトカイン、さらには *Ccl2* などのケモカイン類の発現量が顕著に増加することを明らかにした。CCL2 は、肥満を呈する脂肪組織から過剰に放出され、特に、マクロファージや前駆脂肪細胞を含む SVF において過剰に産生されることで単球の脂肪組織への遊走を促進する因子として肥満の病態発症において重要な役割を担うことが報告されている[29,77]。一方で本研究において、活性化したマクロファージと

の相互作用によって成熟脂肪細胞が CCL2 を過剰に産生し、脂肪組織へのさらなるマクロファージの浸潤を誘発することで慢性炎症の発症に関与する可能性が示され、*in vivo* における両者の相互作用によって引き起こされる脂肪細胞の機能変化が重要な病態シグナルであることが強く示された。本章では、脂肪組織の慢性炎症および全身の代謝異常に関わる脂肪細胞由来の因子として、特に、マクロファージの脂肪組織への浸潤に関連して脂肪細胞において発現量が増加する炎症性のサイトカインに着目した。RT-PCR および real-time PCR 法を用いて、活性化したマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現量が著しく増加する炎症性のサイトカインとして *Ptx3* および *Mmp3* を単離した。一方で、脂肪細胞における発現増加が認められなかった *Tnf- $\alpha$*  などの他の炎症性サイトカインについては、マクロファージにおいて高発現すると考えられた。さらには、肥満脂肪組織における *Ptx3* と *Mmp3* mRNA 発現量と F4/80(+)細胞数には正の相関が認められることから、両因子は肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加に関連して発現誘導することが示唆された。*Ptx3* は、肥満脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞画分 (adipocyte) において高発現している一方で、SVF においてもわずかながら発現が認められた。3T3-L1 細胞および RAW 細胞の cDNA を用いた発現解析によって、*Ptx3* は、未分化または分化した細胞どちらにも発現が認められた一方で、RAW 細胞には、LPS 刺激の有無にかかわらず発現は認められなかった。以上のことから、SVF で確認された *Ptx3* の発現は、前駆脂肪細胞由来と考えられ、*Ptx3* は、脂肪組織に浸潤するマクロファージに応答して脂肪細胞で発現増加する遺伝子である可能性が示された。PTX3 は、C-reactive protein (CRP) や Serum amyloid P (SAP) と同じ Pentraxin family に属する急性期炎症タンパク質として同定されたが、種間において遺伝子配列や制御機構が高度に保存されているなど、その特性は CRP などとは大きく異なる[78,79]。ヒト臨床試験において、PTX3 は、肥満患者の脂肪組織において発現増加し、脂肪組織の PTX3 発現量と BMI 値、血中脂質濃度、および血中 HDL 値は有意な正の相関を示すことが報告された[80]。さらには、心血管代謝リスクの新規の炎症性マーカーとして明らかにされつつあり、心血管疾患の予後不良の予測因子としての利用が検討されている[78]。肥満脂肪組織から過剰に産生される PTX3 は、脂肪組織に浸潤したマクロファージと脂肪細胞との相互作用によって脂肪細胞において産生されることから、脂肪組織の慢性炎症の病態マーカーとしての応用が期待される。さらには、肥満脂肪組織において脂肪細胞から分泌される PTX3 は、肥満関連疾患である動脈硬化症や致死性血管疾患の発症リスクを高めることから、*Ptx3* の遺伝子発現を標的としたマクロファージと脂肪細胞との相互作用を抑制する機能性成分の評価はメタボリックシンドロームの新たな治療薬の創出に繋がると考えられた。*PTX3* 遺伝子のプロモーター領域には NF- $\kappa$ B 転写因子結合領域が含まれ、その転写活性は、TNF- $\alpha$  刺激による ERK1/2 および JNK などの MAPK カスケードを介した NF- $\kappa$ B の活性化によって増加されることが報告された[81]。本研究においてマクロファージとの相互作用によって

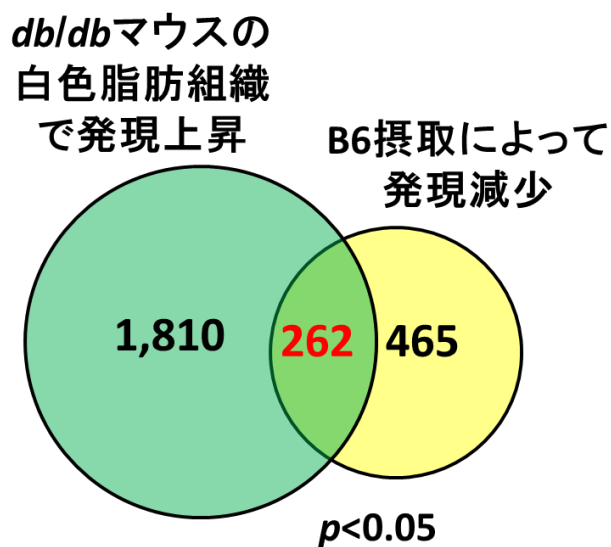


発現上昇した *Ptx3* は、活性化マクロファージが放出する主要な炎症性因子である TNF- $\alpha$  が脂肪細胞に作用し、NF- $\kappa$ B 活性化を介して誘導されることが示唆された。一方、MMP3 は、動脈硬化巣の血管内膜に沈着したマクロファージから大量に産生され、動脈硬化プラークのコラーゲンの分解と再構築を促進し、動脈硬化症の発展に関わる炎症性因子として知られている [82]。肥満患者の血液中には、健常者と比較して MMP3 を含む MMPs が多量に分泌されており、動脈硬化症などの血管系疾患の高リスク要因と考えられている。肥満の進行に伴う脂肪組織は、脂肪細胞の肥大化や細胞数の増加に加えて、血管新生や細胞外マトリックスの分解と再構築が繰り返される組織リモデリングに特徴づけられる [19–21]。肥満脂肪組織において過剰に産生される MMP3 は、脂肪組織の肥大化、発展において重要な役割を担うと共に、血中において増加した MMP3 は動脈硬化症の発症に大きく関与することが想定される。*in vitro* 試験において、活性化マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において *Mmp3* mRNA の発現が増加する一方で、肥満脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞ではわずかな発現しか示さず、逆に、SVF および LPS 刺激した RAW 細胞において高発現したことから、共存培養による脂肪細胞での *Mmp3* 遺伝子の発現増加は、*in vitro* の実験系による人為的なアーチファクトが一部影響を及ぼしたと考えられる。脂肪組織における *Mmp3* 遺伝子の発現量はマクロファージの浸潤量と正の相関を示すが、その発現はマクロファージにおいて強く観察されることから、MMP3 は、肥満脂肪組織に浸潤し活性化したマクロファージから主に産生されると考えられ、肥満脂肪組織のマクロファージの浸潤マーカーとして捉えることが出来る。

本章で選抜したマクロファージの浸潤に関連する候補遺伝子群には、脂肪組織の炎症に関与し、動脈硬化症の発症において重要な役割を担う可能性が考えられる *Ptx3* や *Mmp3* が含まれた。PTX3 は、マクロファージの脂肪組織への浸潤によって脂肪細胞において発現が誘導されることで病態発症に関与する新規の脂肪細胞由来の因子であり、脂肪細胞において発現増加する生理的意義について解析を進めることで、*in vivo* におけるマクロファージと脂肪細胞との相互作用の病態的意義について新たな知見が得られ、メタボリックシンドロームの成因の解明に繋がると期待される。さらには、*Mmp3* も有力な脂肪細胞由来の遺伝子として単離したが、SVF およびマクロファージ RAW 細胞において高発現することから、その発現量は相互作用によって脂肪細胞において発現増加している一面より、脂肪組織に浸潤するマクロファージのマーカーである可能性が考えられた。本研究手法で単離した候補遺伝子群には、マクロファージの浸潤に関連し発現増加することで病態発症において重要な役割を担う脂肪細胞由来の遺伝子が単離されている可能性が考えられ、さらなる遺伝子の発現解析や脂肪細胞において発現増加する意義などについて詳細な解析が期待される。一方で、本研究においては、マクロファージの浸潤に関連して逆に脂肪細胞で発現が低下する遺伝子群の単離も可能である

と想定され、第3章においては、脂肪細胞で発現低下する新規の遺伝子群の同定を試みた。

1-5. 図表



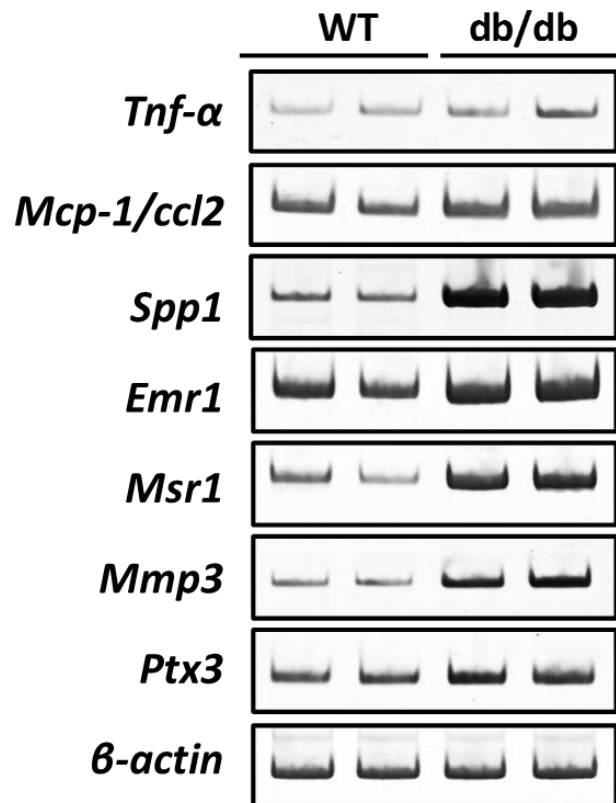
**Fig.1** *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現上昇する因子群と B6 摂取によって発現低下する因子群との比較解析

遺伝性肥満 *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現上昇した 1,810 遺伝子とマクロファージの浸潤を抑制した B6 摂取マウスの白色脂肪組織において発現低下した 465 遺伝子との比較解析によって 262 個の因子群を単離した。

Gene ID	Gene symbol	Gene description	db/db Fold	B6 Fold
<b>cytokines and chemokines</b>				
NM_013652	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.28	0.49
NM_009263	Spp1	secreted phosphoprotein 1	547.3	0.49
NM_009917	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	4.54	0.53
NM_013654	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	2.55	0.55
NM_013693	Tnf	tumor necrosis factor	1.78	0.55
NM_011333	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.81	0.56
NM_011315	saa3	Serum amyloid A3	6.12	0.48
NM_011610	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	2.14	0.65
NM_01074	Nil1rl13	interleukin 1 receptor-like 1	10.3	0.67
NM_011337	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	6.12	0.73
<b>recruited monocyte/macrophage</b>				
NM_145976	BC027057	cDNA sequence BC027057	2.30	0.42
NM_010959	Oit3	oncoprotein induced transcript 3	16.1	0.65
NM_178792	Sirpb1	signal-regulatory protein beta 1	10.9	0.58
NM_007651	Cd53	CD53 antigen	3.18	0.65
NM_010330	Emb	embigin	3.98	0.68
NM_011113	Plaur	plasminogen activator, urokinase receptor	2.95	0.62
<b>cell adhesion</b>				
NM_010809	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	10.1	0.32
NM_008605	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	14.1	0.54
NM_021334	Itgax	integrin alpha X	5.74	0.57
NM_008607	Mmp13	matrix metalloproteinase 13	4.01	0.63
NM_008404	Itgb2	integrin beta 2	1.84	0.67
NM_008319	Icam5	intercellular adhesion molecule 5 (telencephalin)	2.94	0.68
NM_008401	Itgam	integrin alpha M	2.55	0.74
NM_009851	CD44	CD44 antigen	4.33	0.74
<b>macrophage differentiation (including foaming)</b>				
NM_011355	Sfpi1	SFFV proviral integration 1	2.52	0.42
NM_008987	Ptx3	pentraxin related gene	3.31	0.45
NM_031195	Msr1	macrophage scavenger receptor 1	5.44	0.56
NM_009853	Cd68	CD68 antigen	5.24	0.59
NM_011593	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	9.16	0.56
NM_030707	Msr2	macrophage scavenger receptor 2	6.64	0.71

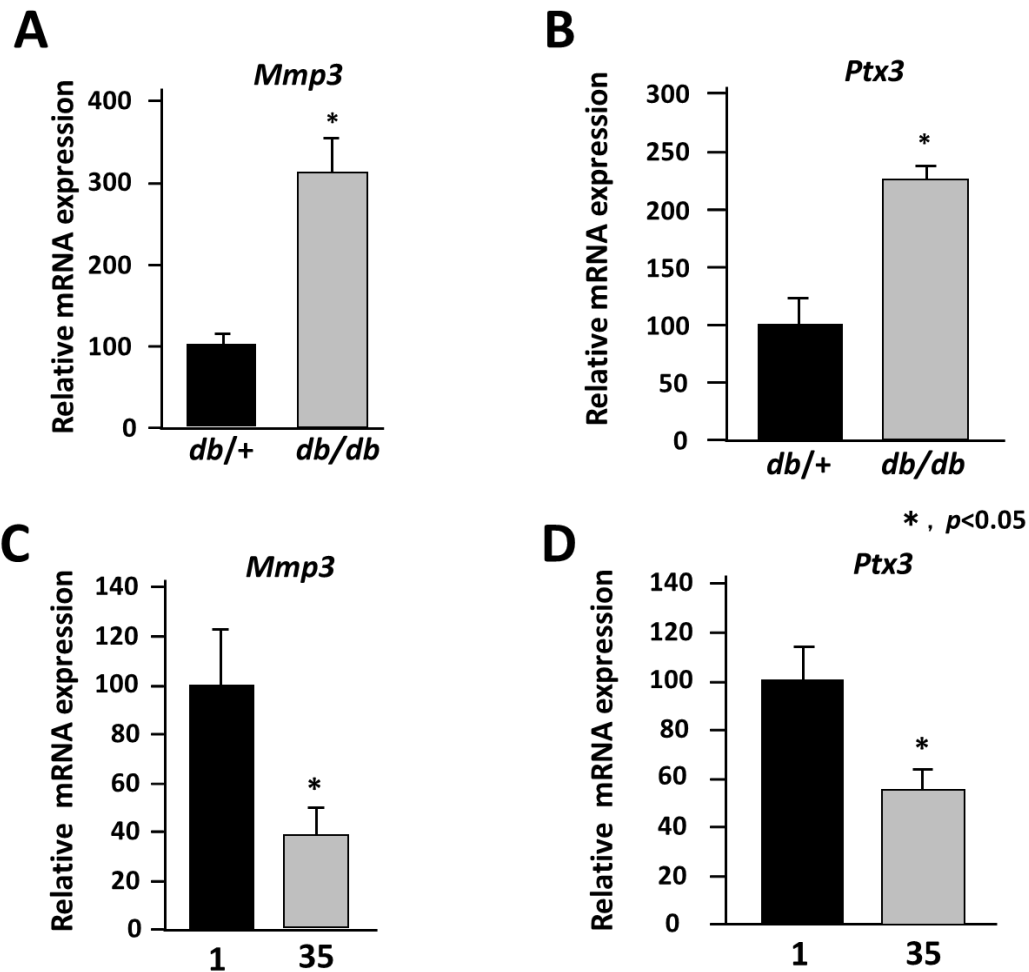
**Table 2** *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現上昇し B6 摂取によって発現低下する因子群

Fig. 1 で単離された因子群 262 個の一部の因子の遺伝子発現変動を示す。赤色はコントロールマウス *db/+* と比較した際の *db/db* の発現上昇（倍率）を、青色は高容量の B6 摂取による発現量の低下（倍率）を示している。単球・マクロファージの既知のマーカー遺伝子や遊走に関わるケモカイン遺伝子を含んでおり、単球・マクロファージの浸潤に関連した因子群が多く含まれている。



**Fig.2** *db/db* マウスの白色脂肪組織における発現解析

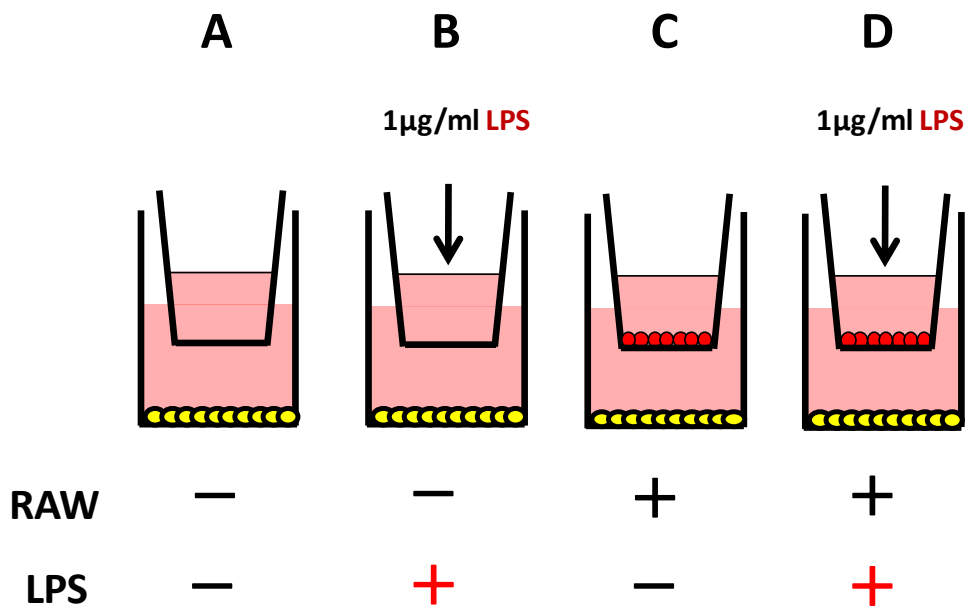
コントロールマウスとして *db/+*、および肥満 *db/db* マウスの白色脂肪組織における mRNA の発現解析を示す。*Tnf-α*、*Mcp-1/ccl2*、*Spp1*、*Emr1*、*Msr1*、*Mmp3*、および *Ptx3* の mRNA 発現を RT-PCR 法によって解析し、肥満脂肪組織においてマクロファージマーカー遺伝子、炎症性サイトカインやケモカイン遺伝子の発現上昇を確認した。



**Fig.3** real-time PCR 法による *Ptx3* および *Mmp3* 遺伝子の発現解析

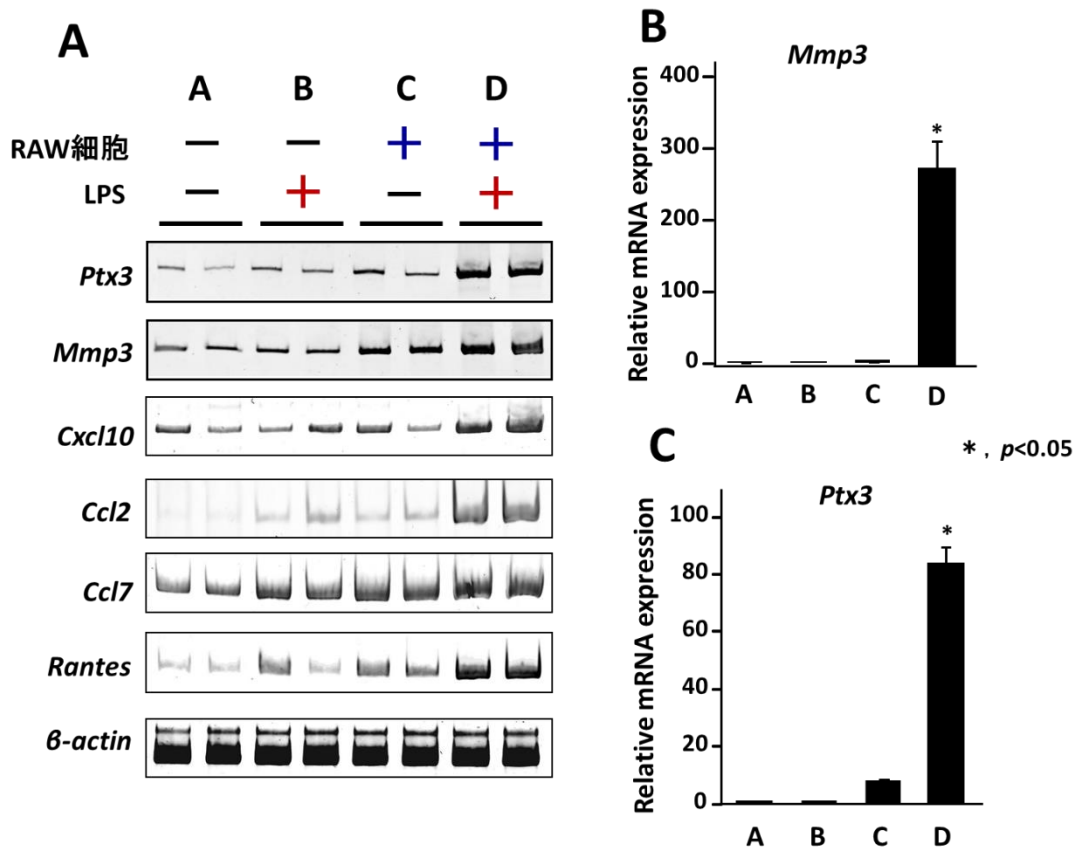
コントロールマウスとして *db/+*、および肥満 *db/db* マウスの白色脂肪組織における *Mmp3*、および *Ptx3* の mRNA 発現を real-time PCR 法によって解析した (n=3)。 *db/db* マウスの白色脂肪組織において両遺伝子の mRNA の発現量は有意に増加した (A, B)。また、両遺伝子の 1 mg/kg vitamin B6、および 35 mg/kg vitamin B6 摂取マウスの白色脂肪組織における発現解析の結果、35 mg/kg の B6 を摂取させたマウス (n=12) において *Ptx3*、および *Mmp3* mRNA の有意な発現量の低下を示した (C, D)。

- RAW264.7細胞
- 3T3-L1細胞



**Fig.4** マウスマクロファージ RAW264.7 細胞とマウス前駆脂肪 3T3-L1 細胞との共存培養系

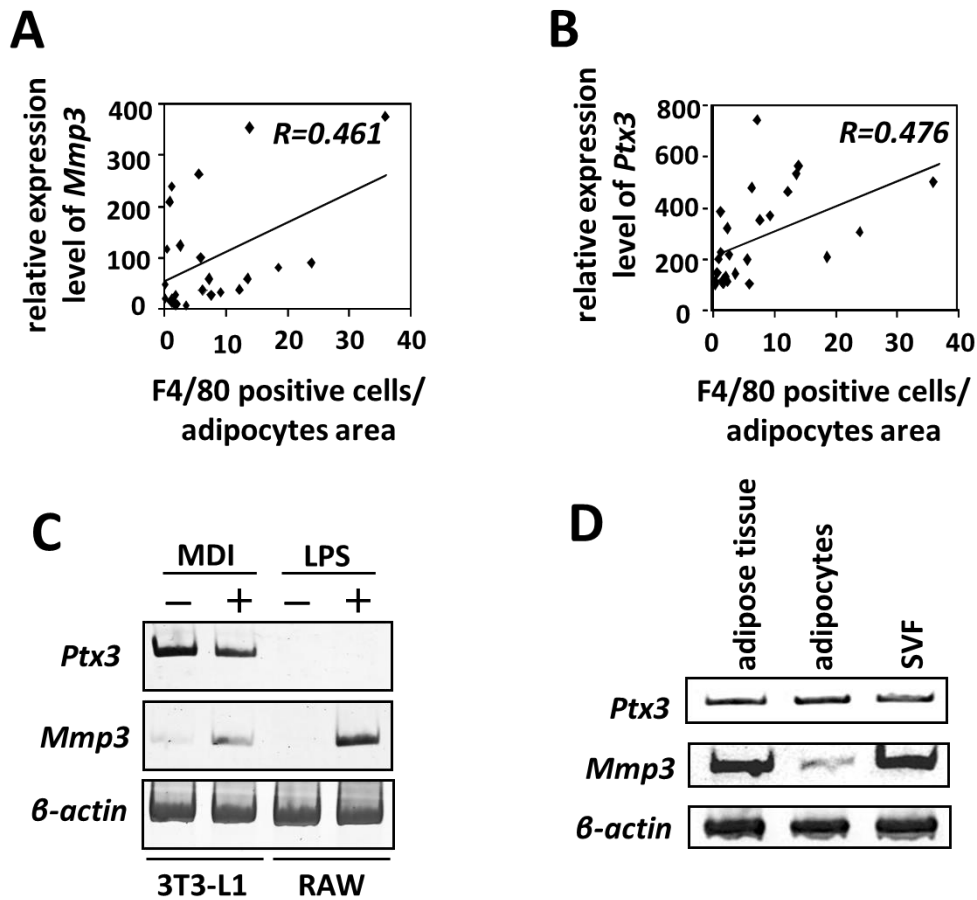
各区において、3T3-L1 細胞を成熟脂肪細胞へと分化させた後、C 区および D 区において transwell 上に RAW264.7 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/well の条件で播種した。D 区においては RAW 細胞を LPS により活性化させ、対照群として B 区において RAW 細胞を播種せずに LPS の投与を行った。また A 区において transwell のみを設置した。LPS 添加から 24 時間、および 48 時間後の mRNA を抽出し、発現解析に供した。なお、B 区においては LPS の脂肪細胞に対する直接的な作用を検討するために設置した。



**Fig.5** 共存培養系におけるマウス前駆脂肪 3T3-L1 細胞の遺伝子発現解析

各区の 3T3-L1 細胞由来の cDNA を用いて、RT-PCR 解析および real-time PCR 法により発現解析を行った。RT-PCR 解析の結果、*Ccl2*、*Rantes*、*Ccl7*、および *Cxcl10*、*Ptx3*、*Mmp3* の mRNA 発現量は活性化した RAW 細胞との相互作用によって 3T3-L1 細胞において著しく増加した (A)。さらに、real-time PCR 解析によって *Ptx3*、*Mmp3* の mRNA の定量解析を行った結果、活性化した RAW 細胞と共存培養させた 3T3-L1 細胞において有意に発現量が増加した (B,C)。





**Fig.6** *Ptx3* および *Mmp3* mRNA 発現量と白色脂肪組織に浸潤する単球・マクロファージ細胞数との比較解析

各マウス個体において、脂肪組織に浸潤した単球・マクロファージ細胞数を F4/80 抗体を用いた免疫組織染色により定量化し、また *Ptx3*、および *Mmp3* の mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量化した。pearson の積立相関解析を実施し、両指標の相関の有無を解析した結果、浸潤した単球・マクロファージの細胞数と *Ptx3*、および *Mmp3* の mRNA 発現量は正の相関を示した (A, B)。未分化 (MDI-) または分化誘導後 14 日目 (MDI+) および、無刺激または LPS 刺激による活性化 RAW264.7 細胞の *Ptx3*、および *Mmp3* の mRNA の発現を RT-PCR 法により解析を行った (C)。食餌性肥満マウスの白色脂肪組織を酵素分散法により分画し、*Ptx3* および *Mmp3* の発現を RT-PCR 法にて解析を行った (D)。*Ptx3* は *in vivo* における成熟脂肪細胞に mRNA 発現が認められた。

## 第2章 マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現増加する *Ikkε* の単離

### 2-1. 序論

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は、全身性の軽微な炎症によって生じるインスリン抵抗性が重要な基礎疾患と考えられている。インスリン抵抗性は、血液中のグルコース濃度（血糖値）の上昇に伴って膵β細胞より十分な量のインスリンが血中へ分泌される一方で、インスリン標的組織である筋肉や肝臓、脂肪組織におけるインスリン作用が低下し、糖の取り込みが抑制されるなど血糖値の調節機構が著しく障害されている状態である。そのため、インスリン抵抗性を発症している患者では、持続的な高血糖状態となり、膵臓、肝臓、心臓など各組織の恒常性が破綻する結果、糖尿病や動脈硬化症など致死性の疾患群を続発する[83]。肥満の進行に伴い肥大化した内臓脂肪組織では、TNF-αやCCL2、IL-1βなどの炎症性サイトカインが多量に産生され、肥満脂肪組織において慢性炎症が生じていることが見出された。さらには、脂肪組織で産生された炎症性サイトカインは血中にも分泌され、インスリン標的臓器を含め全身において軽微な炎症を誘発することから[84]、脂肪組織の慢性炎症がメタボリックシンドロームの発症において重要な基盤病態であると考えられ、肥満脂肪組織における慢性炎症の発症メカニズムの解明が求められている。

NF-κBは、生体における炎症反応において重要な役割を担う炎症性の転写因子としてその生理的および病態的な意義について多数の報告がなされている[85–87]。これまでにNF-κBは、制御因子であるinhibitor of κB (IκB)と複合体を形成した不活性型で細胞質内において存在し、炎症性サイトカインであるTNF-αやIL-1β、さらには酸化ストレスなどの刺激により活性化されるinhibitor of κB kinase (IKKs)によってIκBが分解されることで、NF-κBの核内への移行が促進され、標的遺伝子の発現を誘導することが明らかにされている[87]。肥満病態モデルを用いた動物試験において、肥満の進行に伴って脂肪組織ではinhibitor of κB kinase β (IKKβ)の活性化を介するNF-κBの活性化が観察され、さらにその標的遺伝子であるTNF-αやIL-1βなどの炎症性サイトカインの血中濃度と肥満度とは正の相関を示すことが明らかにされた[10]。さらには、骨格筋や肝臓などのインスリン標的組織においてもNF-κBの活性化が観察されており、インスリン抵抗性の発症にはNF-κBの活性化を介する炎症反応が深く関与することが示唆されている[88,89]。このように肥満時には、インスリン標的臓器を含め全身においてNF-κBは活性化されるが、肝細胞特異的にIKKβを欠損させ、遺伝的にNF-κBの活性化を阻害したマウスに高脂肪食を負荷し、肥満を誘導した際には、肝臓でのインスリン感受性が増加し、肥満に伴うインスリン抵抗性に対して改善効果を示すことが報告された[89]。一方で、筋肉や脂肪組織におけるインスリン感受性は改善されなかったことから、肝臓のNF-κBを介した炎症反応は、全身性の炎症反応には影響せず、肝臓局

所的にインスリン抵抗性を惹起していると考えられた。一方で、全身において重要な生理機能を発揮する骨髄性の細胞特異的に IKK $\beta$  を欠損させたマウスでは、高脂肪食負荷による肥満誘導に伴った耐糖能の悪化は生じず、またインスリン標的組織におけるインスリンの感受性が増加したことから、骨髄由来のマクロファージや好中球の NF- $\kappa$ B の活性化が全身のインスリン抵抗性に関与すると考えられた[90]。

2003 年に Weisberg らによって、ヒトやマウスの肥満脂肪組織においてマクロファージの浸潤量が増加することが報告された[25]。脂肪組織に浸潤するマクロファージは、肥大化しネクロシスを起こした脂肪細胞を取り囲むように集積しており、特に、NF- $\kappa$ B の標的遺伝子を多量に産生する M1 型のマクロファージが蓄積している。これまでに脂肪組織の慢性炎症の発症において、脂肪組織へと浸潤するマクロファージが重要な役割を担うことが示唆されたが、その生理的機能は未だ不明な点が多い。Suganami らによって *in vitro* におけるマクロファージと脂肪細胞との共存培養系を用いた解析が実施され、NF- $\kappa$ B の活性化を介する両者の paracrine loop が観察され、慢性炎症の発症において両者の相互作用が特に重要な病態シグナルとして明らかにされた[68]。極最近の報告では、3T3-L1 細胞を用いた *in vitro* 試験によって、活性化マクロファージの培養上清によって刺激を行った脂肪細胞では、刺激を行っていない脂肪細胞と比較してインスリン刺激によるグルコース取り込み能が有意に低下しており、活性化マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞における代謝機能が著しく障害されている可能性が示されている[68,69]。このように、*in vitro* における解析によって、NF- $\kappa$ B の活性化を介する両者の相互作用が炎症性サイトカインの発現量を増加させ、慢性炎症の発症に寄与するのみならず、脂肪細胞のインスリン感受性を阻害し脂質合成など生理機能の破綻を引き起こすことが示唆された。一方で、*in vitro* 試験によって明らかにされた両者の相互作用による脂肪細胞の代謝不全や炎症性サイトカインの発現上昇などの研究結果は、*in vivo* における肥満脂肪組織の生理的な現象を十分に観察できているとは言い難い。また、骨髄性の細胞特異的に NF- $\kappa$ B の活性化を阻害したマウスでは、脂肪組織における炎症反応が減少し、インスリン抵抗性は改善されるが[90–92]、活性化マクロファージと脂肪細胞との相互作用も阻害されており、*in vivo* における慢性炎症の発症に対する両者の paracrine loop の生理的な関与は明らかにされていない。

前章において、vitamin B6 を高含量で摂取させたマウスを肥満時の脂肪組織へのマクロファージの浸潤を選択的に抑制する動物モデルとして利用し、マクロファージと脂肪細胞との相互作用による病態シグナルを *in vivo* において解析可能としている。さらには、マクロファージの浸潤に関連して脂肪細胞において発現が変動することで肥満の病態発症に関わる候補遺伝子として *Ptx3* を同定した。PTX3 は、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞から分泌される急性期炎症タンパク質であり、脂肪組織の慢性炎症を含め、肥満の病態発症に関わる因子であると想定された。一方で、マクロファージとの相互作用によって *in vivo* の脂肪細胞において発現変動することで肥満の病態

発症に関わるシグナル伝達機構については解明されていない。本章では、前章で単離したマクロファージの浸潤に関連する候補遺伝子群の中で、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現増加することで肥満の病態発症に関与する脂肪細胞由来の候補遺伝子として、NF- $\kappa$ Bの活性化に関わるシグナル伝達因子であり、かつ近年、インスリン抵抗性などの病態発症と関連することが報告された *Inhibitor of  $\kappa$ B kinase epsilon (Ikke)*に着目し、*Ikke*の発現解析を通して、病態発症に関与する脂肪細胞における IKK $\epsilon$ の生理的意義について検討を行うこととした。

## 2-2. 研究材料、および実験手法

### 2-2-1. 一般試薬

一般試薬には主に nacalai tesque、Sigma の特級試薬を用いて行い、本章で使用した試薬の一部は略号に記載したように簡略化している。

### 2-2-2 polyacrylamide gel 電気泳動用試薬の調製

1-2-2 の項に準じて行った。

### 2-2-3. 動物飼育

本研究で行う動物実験は、広島大学動物実験委員会において実験の手順、および方法について広島大学承認番号 C11-23 において承諾を得た後、関連する法令等を遵守しながら遂行している。

#### dbldb マウスの飼育

6 週齢の *dbldb* 雄性マウス、およびコントロールとして *dbl+*雄性マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。飼育条件は、1-2-3. dbldb マウスの飼育の項に記載した。

#### C57BL/6J マウスの飼育

5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。馴化期間として、購入後 1 週間は水と固形飼料を自由摂取させ、実験に用いた。6 週齢以降、実験食として脂肪分 60% (カロリー比) を含む高脂肪飼料 HFD-60 を 8 週間、または 16 週間与えた。コントロール (ND) マウスは 6 週齢以降、通常食 AIN-93G を自由摂取させた。

### 2-2-4. 白色脂肪組織の抽出および RNA 抽出

絶食 5 時間後に精巣周囲の白色脂肪組織を抽出した。抽出した脂肪組織重量を測定し、精巣周囲からもっとも遠位に位置する脂肪組織片 (約 0.3~0.5 g) をハサミで抽出し、QIAzol reagent (Qiagen) 2 ml に加え、ホモジナイザーで完全に破碎して 30 分間室温にて静置した後、total RNA の調製まで-80°C で保存した。脂肪組織からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit(Qiagen)を用いて 1-2-4 の項と同様に行った。

## 2-2-5. 酵素分散法による成熟脂肪細胞と SVF の分離

### collagenase type I 溶液の調製

collagenase type I (worthington 社製)を 1 mg/ml となるように PBS(-)で調製し、collagenase type I 溶液として使用した。

### 成熟脂肪細胞画分と SVF の分離

2-2-4 の項で摘出した *db/db* マウスおよび *db/+*マウスの脂肪組織 (n=3) 約 0.3 g を別々に 6 mm /dish に入れ、ハサミと手術用メスで細切後それぞれを 50 ml 容チューブに入れ、15 ml の collagenase Type I 溶液に浸した後、37°C で 30 分間振とうした (stroke 88/min)。その後、cell strainer 100 µm (BD Falcon 社製)でフィルトレートし、遠心(300 g、5 分間)を行った。上清のうち、最上部を 100 µl 回収し、成熟脂肪細胞とした。その後上清を除去し、1×PBS を 100 µl 加えて懸濁した後、再度遠心(300 g、5 分間)し、その沈殿物を間質・血管系画分(stromal vascular fraction: SVF)とした。QIAzol Reagent を成熟脂肪細胞層には 500 µl 、SVF には 900 µl 加えて 30 分室温にて静置した後、total RNA の調製まで-80°C で保存した。

### total RNA の調製

分離した成熟脂肪細胞と SVF からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen)を用いて、1-2-6. total RNA の調製の項と同様に行い、逆転写反応によって cDNA を作製した。

## 2-2-6. RT-PCR 解析

### 逆転写反応による cDNA の合成

1-2-7 の項と同様に、ReverTra Ace RT (TOYOBO 社製)を用いて cDNA 合成を行った。合成した cDNA を用いて Go-Taq DNA polymerase (Promega) による PCR 反応を行い、反応終了後に 5% PAGE で電気泳動を行った。電気泳動は 1×TBE の泳動 buffer を用い、200 V の定電圧で 50 分間の条件で行った。電気泳動終了後、gel を ethidium bromide 溶液に浸し、UV 照射により増幅 DNA のバンドのパターンを確認した。

以下に PCR 反応の手順を記す。

PCR 反応は 1 サンプルあたり以下の反応スケールでサンプルを調製した。

### Go-Taq Green master mix (20 µl scale)

Green master mix	10.0 µl
Nuclease free water	8.0 µl
cDNA	1.0 µl

sense primer                    0.5  $\mu$ l  
antisense primer                0.5  $\mu$ l

スピンドウンした後、PCR 用 8 連チューブに上記の反応液を加えた。95°C で 2 分間熱処理し、95°C 40 秒間→58°C 40 秒間→72°C 1 分間の条件下で、計 30 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。

本研究で使用した合成 primer は全て 100  $\mu$ M で使用した。下記に使用した合成 primer を記す。

mouse *Tnf- $\alpha$*

sense primer                    5'-CCGATGGGTTGTACCTTGTC-3'  
antisense primer                5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'

mouse *Emr1*

sense primer                    5'-ATTGTGGAAGCATCCGAGAC-3'  
antisense primer                5'-GTAGGAATCCCGCAATGATG-3'

mouse *Ikk $\epsilon$*

sense primer                    5'-CAAGCTGGAGATGATGAGA-3',  
antisense primer                5'-GGCTGTGAGCTCCACTCCAAG-3'

$\beta$ -actin (mouse, human)

sense primer                    5'-TTGGGTATGGAATCCTGTGGCATC-3'  
antisense primer                5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'

mouse *L-19*

sense primer                    5'-GGCATAGGGAAGAGGAAGG-3'  
antisense primer                5'-GGATGTGCTCCATGAGGATGC-3'

**real-time PCR による発現解析**

real-time PCR 反応は THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)を使用し、**1-2-7. real-time PCR による発現解析**の項と同様の反応組成および反応条件で行った。

**2-2-7. 細胞の培養、および共存培養法**

**3T3-L1 細胞の継代培養および分化誘導**

**【PBS 溶液の調整】**

1-2-8.の項と同様に作製し、使用した。

【DMEM 培地の調整】 および【分化誘導培地 (MDI)】の調製は、1-2-8.の項に記載した方法で調製し、以下の培養実験に使用した。3T3-L1 細胞の分化誘導は、1-2-8.の項に記載した定法に従って行い、すべての培養実験はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

#### **RAW264.7 細胞(RAW 細胞)の継代培養および培養上清の回収**

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW 細胞の培養は、DMEM 培地を用いて、1-2-8.の項に記載した方法に準じて行った。RAW 細胞の培養上清 (MacCM) の調整法を以下に記す。100 mm×20 mm cell culture dish (CORNING 社製) に  $1 \times 10^7$  cells/dish の条件で RAW 細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養を行った。最終濃度 1 µg/ml となるように lipopolysaccharide (LPS) (Sigma 社製) を添加した。この添加した時間を LPS 刺激 0 時間とし、LPS 刺激 8 時間後の培養上清を 15 容ファルコンチューブに回収し、-80°C で保存した。LPS 刺激を行わない未刺激の培養上清は、RAW 細胞を播種し、24 時間培養後に培地交換を行い、培地交換時間を 0 時間として 8 時間後の上清を回収し、-80°C で保存した。

#### **Transwell system を用いた共存培養**

共存培養は、Costar 社製のクリアタイプの 12 well cell culture plate を使用し、1-2-9 の項に記載した方法で行った。

#### **RAW 細胞の培養上清による 3T3-L1 細胞の刺激**

12 well culture plate (Costar 社製) に 3T3-L1 細胞を  $8 \times 10^4$  cells/dish の条件で播種した。定法に従って分化誘導を行い、分化誘導 8 日後 (day8) の成熟脂肪細胞を作製した。-80°C 保存しておいた RAW 細胞の培養上清を 0.45 mm フィルター (Millipore 社製) を用いてろ過滅菌を行い、そのうち 3 ml を 15 容チューブに入れた。当量の DMEM 培地で希釈を行い、培養上清を 50% となるように混合した。混合した培養上清を、day8 の成熟脂肪細胞の DMEM 培地と培地交換を行うことで刺激を行った。

#### **IL-1β および Tnf-α による 3T3-L1 細胞の刺激**

12 well culture plate (Costar 社製) に 3T3-L1 細胞を  $8 \times 10^4$  cells/dish の条件で播種した。定法により分化誘導を行い、分化誘導 8 日後 (day8) の成熟脂肪細胞を作製した。終濃度 10 ng/ml となるように recombinant mouse TNF-alpha (R&D systems 社製) を DMEM 培地に加え、培地効果を行うことで刺激を行った。同様に、分化誘導 8 日後 (day8) の成熟脂肪細胞を作製し、終濃度 5 ng/ml となるように recombinant human IL-1-beta (R&D systems 社製) を DMEM 培地に加え、培地交換によって細胞刺激を行



った。無刺激の細胞群は、DMEM 培地に PBS(-)を加え、培地交換を行った。

#### **培養細胞からの total RNA の抽出、および RT-PCR 解析**

共存培養 24 時間後、または培養上清による刺激 18 時間後の 3T3-L1 細胞の培地を取り除き、QIAZOL Reagent を 500  $\mu$ l ずつシャーレに加え、セルスクレーパーで細胞の接着を剥がし、溶液全量を 1.5 ml 容チューブに回収した。TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  によって 24 時間サイトカイン刺激を行った 3T3-L1 細胞の培地を取り除き、QIAZOL Reagent を 500  $\mu$ l ずつシャーレに加え、セルスクレーパーで細胞の接着を剥がし、溶液全量を 1.5 ml 容チューブに回収した。室温にて 3 分間静置した後、chloroform を 100  $\mu$ l ずつ加え 15 秒間激しく vortex を行い、さらに 3 分間静置した。その後遠心(12,000 g、4°C、10 分間)を行い、上清を新しい 1.5 ml 容チューブに回収し、**1-2-4** の項で記した組織からの RNA 抽出と同様に、RNeasy Lipid Tissue Mini kit を用いて total RNA の抽出を行った。回収した RNA 濃度を nano drop 2000 を用いて測定し、1  $\mu$ g 相当の total RNA を用いて **1-2-7** の項と同様に逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

## 2-3. 実験結果

### 2-3-1. 遺伝性肥満および食餌誘導肥満マウスにおける *Ikke* mRNA の発現解析

*dbl/db* および *dbl/+* マウス (各群 n=3) の各個体の脂肪組織由来の total RNA を抽出し、逆転写反応に供し、cDNA を調製した。*Ikke* 遺伝子の特異的 primer を設計し、real-time PCR 法にて各個体の *Ikke* の発現量を定量解析したところ、*dbl/+* マウスと比較して *dbl/db* マウスの脂肪組織において *Ikke* 発現量が 2.5 倍高いことが分かった (Fig.7A)。*dbl/db* マウスにおいては、他の *Ikk family* 遺伝子である *Ikka*、*Ikkβ* の発現量に有意な差は認められなかった (データ非掲載)。さらに、C57BL マウスを AIN93 食摂取群 (通常食群) または高脂肪食飼料を負荷した HFD 群の 2 群に分け、16 週間自由摂食によって食餌誘導性の肥満を誘導した。屠殺後、精巣周囲白色脂肪組織を摘出し、各個体 (各群 n=4) の脂肪組織由来の total RNA を抽出し、逆転写反応に供して cDNA を調製した。HFD 群は、通常食群と比較して体重や組織重量が有意に増加しており、またマクロファージのマーカー遺伝子である *Emr1* や *Msr1* の発現も有意に増加した。*Ikke* の遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析したところ、HFD 群において *Ikke* 発現量は 3.5 倍有意に増加していた (Fig.7B)。

### 2-3-2. B6 摂取マウスの脂肪組織における *Ikke* mRNA の発現解析

第 1 章において、1 mg/kg の B6 摂取群と比較して 35 mg/kg の B6 摂取群の脂肪組織においてマクロファージの浸潤量が特異的に減少しており、脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連した遺伝子群を探索する動物モデルとして利用可能であることを示した。B6 摂取マウスの脂肪組織の cDNA (各群 n=12) を用いて、real-time PCR 法によって個体別に *Ikke* の発現量を解析した結果、B6 摂取量の増加によって *Ikke* の発現量は 40% 程度有意に低下することを明らかにした (Fig.7C)。*Ikke* の白色脂肪組織での発現量を real-time PCR 法を用いて定量し、一方、マクロファージのマーカーである F4/80 抗体を用いた組織免疫染色によって脂肪組織内のマクロファージ浸潤数を測定した。脂肪組織の両指標における相関の有無を Pearson の積率相関分析によって解析した結果、両指標の間に有意な正の相関を認めた (Fig.8A)。collagenase を用いた酵素分散によって、遺伝性肥満 *dbl/db* または野生型 *dbl/+* マウス (n=3) の精巣周囲白色脂肪組織より成熟脂肪細胞画分 (adipocyte) を単離した。各細胞より total RNA を抽出し、RT-PCR および real-time PCR 法を用いて *Ikke* の発現解析を行った結果、肥満脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞画分において *Ikke* の発現量が 2.5 倍有意に高いことを明らかにした (Fig.8B)。同様に高脂肪食摂取マウスおよび通常食摂取マウスの精巣周囲白色脂肪組織より成熟脂肪細胞画分を分画し、RT-PCR 法を用いて *Ikke* の発現解析を行った結果、高脂肪食摂取マウスから単離した成熟脂肪細胞画分において *Ikke* の発現が高まっていることを明らかにした (Fig.8 C)。

### 2-3-3. マクロファージ RAW 細胞と共存培養した 3T3-L1 細胞の *Ikke* mRNA の発現解析

RAW 細胞と 3T3-L1 細胞を transwell system を用いて共存培養し、*in vitro* において両

細胞の相互作用が *Ikke* の発現に及ぼす影響を解析した。RAW 細胞と共存培養を行った 3T3-L1 脂肪細胞由来の cDNA を調製し、RT-PCR 法によって *Ikke* の発現解析を行った。その結果、LPS 刺激により活性化した RAW 細胞と共存培養を行った 3T3-L1 細胞において *Ikke* の発現量は著しく増加した (Fig.9A)。LPS 刺激した RAW 細胞の培養上清を調製し、一方で対照群として LPS 刺激を行わない RAW 細胞の培養上清を調製した。定法に従って分化成熟させた 3T3-L1 細胞 (d8) を用意し、培地交換により RAW 細胞の培養上清をそれぞれ加えて刺激を行い、刺激 18 時間後の 3T3-L1 細胞より total RNA を調製し、逆転写反応によって cDNA を作製した。*Ikke* の発現量を real-time PCR 法により定量解析を行った結果、*Ikke* の発現量は、対照群と比較して LPS 刺激を行った RAW 細胞の培養上清を加えた 3T3-L1 細胞において 11 倍有意に増加した (Fig.9B)。以上の結果から *Ikke* は、肥満脂肪組織に浸潤する活性化マクロファージとの相互作用によって、脂肪細胞において発現が誘導されることが示された。

#### **2-3-4. 脂肪細胞における *Ikke* mRNA 発現の誘導メカニズムの解析**

脂肪組織に浸潤したマクロファージは、NF- $\kappa$ B 経路の活性化によって TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  を放出し、脂肪細胞へ作用することが明らかにされている。本研究において、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において *Ikke* の発現が増加するメカニズムを明らかにするために、マクロファージの放出する主要なメディエーターである TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  で刺激した際の *Ikke* の発現量を解析した。成熟 3T3-L1 細胞へ TNF- $\alpha$  (10 ng/ $\mu$ l) および IL-1 $\beta$  (5 ng/ $\mu$ l) をそれぞれ添加し、対象群として PBS(-)を加えた。刺激 24 時間後に、3T3-L1 細胞から total RNA を抽出し、real-time PCR 法によって *Ikke* の発現量を解析した。その結果、対象群と比較して TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  のサイトカイン刺激によって *Ikke* の発現量は 4 倍、2 倍とそれぞれ有意に増加した (Fig.9C、D)。さらには、脂肪組織における *Ikke* の発現量と TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の発現量との間にはそれぞれ有意な正の相関が認められたことから (Fig.10A、B)、*Ikke* は、肥満脂肪組織に浸潤したマクロファージの放出する TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  によって脂肪細胞において発現が増加することが示された。

## 2-4. 考察

本章では、脂肪組織へ浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用に影響される脂肪細胞の遺伝子の発現変化を *in vivo* において解析し、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現が誘導される候補遺伝子として *Ikkε* に着目した。IKKε は、Inhibitor of κB kinase (IKK) family に属し、古くから知られている IKKα や IKKβ と高いホモログを有するプロテインキナーゼとして同定された[93]。IKKα/β は、Inhibitor of κB (IκB) のリン酸化を介して NF-κB の核内移行を促進し、炎症反応を制御する重要なタンパク質として従来から明らかにされている一方で、IKKε の生理機能は十分には明らかにされていない。IKKε は、全身において恒常的に発現する IKKα/β とは異なり、胸腺や脾臓、末梢血中の白血球細胞など限られた組織において発現し、LPS 刺激やウイルス感染によって TLR などの病原センサー受容体を介する NF-κB シグナルの下流の因子として発現量が増加することが知られている[94,95]。極最近では、*Ikkε* 遺伝子の発現量は、肥満に伴って肝臓や脂肪組織において有意に増加することが見出された[96,97]。さらには、*Ikkε* 遺伝子のノックアウトマウス (IKKε-KO) を用いた解析によって、高脂肪食負荷による肥満の誘導試験において、野生型マウスと比較して肥満に伴う脂肪組織の炎症性サイトカインの産生量は低下し、インスリン抵抗性などの代謝異常が改善されることが示されたが、発現増加する IKKε が全身の代謝異常に関与する分子メカニズムは不明なままである[97]。本章において、遺伝性肥満マウスまたは食餌誘導性肥満マウスの精巣周囲白色脂肪組織の *Ikkε* の発現量は、対象群である正常マウスの脂肪組織と比較して有意に増加する一方で、マクロファージの脂肪組織への浸潤が抑制される vitamin B6 (B6) 摂取マウスの脂肪組織では、*Ikkε* の発現量は有意に低下することを見出した。さらには、肥満脂肪組織における *Ikkε* 発現量と F4/80(+)細胞数とは有意な正の相関を示し、肥満脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞における *Ikkε* 発現量は、正常マウスから単離した成熟脂肪細胞と比較して有意に高いことを明らかにした。以上のことから、IKKε は肥満脂肪組織に浸潤するマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現増加し、インスリン抵抗性などの病態発症に関与する可能性が考えられる。また、IKKε は、IKKs のリン酸化の標的因子である NF-κB のみならず、Interferon (IFN) 関連遺伝子の転写調節を担う Interferon related factor (IRF) の C 末端基をリン酸化し、標的遺伝子である炎症性因子や Type 1 IFN のような抗ウイルス因子の転写を促進することで自然免疫反応や炎症反応を増強することが明らかにされている[98]。肥満の脂肪組織に浸潤するマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において *Ikkε* の発現が増加することは、IKKε の標的因子である NF-κB や IRF3、IRF7 などの炎症性の転写因子が脂肪細胞で活性化され、炎症性サイトカインの産生を増加することで、全身の代謝異常の引き金となる脂肪組織の慢性炎症の発症に関与している可能性が示された。

IKKε-KO マウスは、高脂肪食負荷による耐糖能の悪化に抵抗性を示し、さらには血中のコレステロールは減少する一方で、インスリン感受性を改善する核内受容体型転写因子 PPARγ の発現が増加し、さらには、脂肪細胞由来の善玉 adipocytokine である adiponectin の発現

も亢進していることが示された。逆に、3T3-L1 細胞に IKK $\epsilon$  を過剰発現させることで、脂肪細胞のインスリン感受性は低下し、糖取り込み能が減退した[97]。また、以前の *in vitro* 試験において、活性化した RAW 細胞と共存培養を行った 3T3-L1 細胞では、adiponectin の産生量が低下していることが示されている[68]。以上のことから、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤によって脂肪細胞において発現が誘導される *Ikke* は、*Ppar $\gamma$*  の発現を抑制し、さらには adiponectin の産生量を低下させることで脂肪細胞のインスリン作用が減退し、脂肪組織の慢性炎症などの病態発症に関与している可能性が示された。また IKK $\epsilon$ -KO マウスは、正常マウスと比較して摂食量や運動量に違いは認められない一方で、高脂肪食負荷による体重増加は有意に抑制されていた。実際に、高脂肪食負荷によって食事誘導性の肥満を発症させた IKK $\epsilon$ -KO マウスの脂肪組織において、熱産生遺伝子である *uncoupling protein 1 (Ucp1)* の発現が正常マウスの脂肪組織と比較して有意に高く、またエネルギー消費量が増加していた。これらは、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現が誘導される *Ikke* が、転写因子のリン酸化を介して *Ucp1* の発現を抑制し、エネルギー消費を減少させている可能性が考えられた。近年では、寒冷刺激や  $\beta 3$  アドレナリン刺激によって白色脂肪細胞が褐色脂肪細胞様の形質を獲得する *browning* (褐変化) が生じることが報告されている[99–102]。白色脂肪細胞の褐変化には、脂肪組織における M2 型マクロファージの *tyrosine hydroxylase (TH)* の発現を介して産生される catecholamine が重要な役割を担うことが報告されたが[103]、adiponectin の減少によって M2 型マクロファージ数は減少する。さらには、M1 型マクロファージが放出する炎症性サイトカインによって褐変化が阻害されることが報告されており、本章においてマクロファージとの相互作用によって、脂肪細胞において *Ikke* が発現増加することで、adiponectin の産生は低下し、さらには *Ucp1* の転写を直接低下させることで褐変化を阻害する可能性が示された。

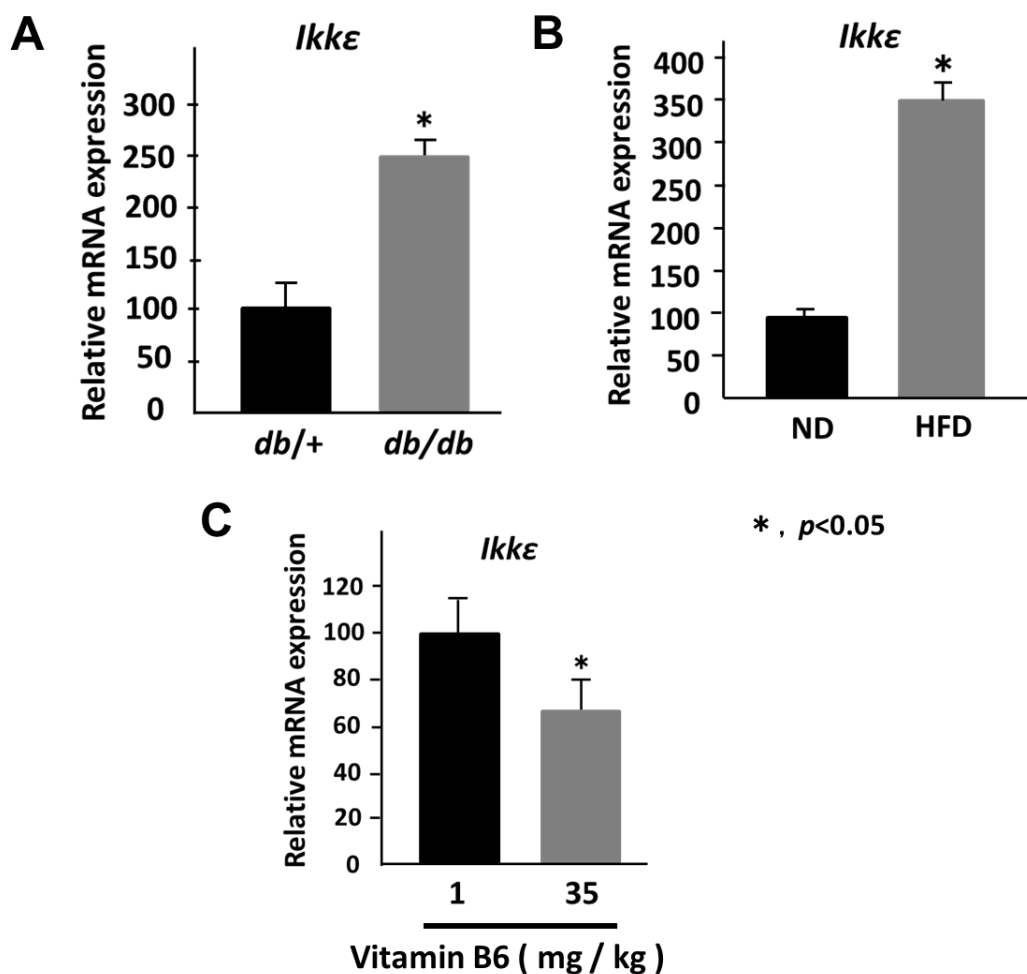
本研究では、独自に構築した RAW 細胞と 3T3-L1 脂肪細胞との共存培養系を用いて、脂肪細胞において発現が増加する *Ikke* 遺伝子の発現解析を行った。LPS 存在下で活性化した RAW 細胞と共存培養した 3T3-L1 細胞において *Ikke* の発現は増加し、また、活性化 RAW 細胞の培養上清により刺激を行った脂肪細胞においても発現量は有意に増加していた。一方で、B6 の活性体である PLP を脂肪細胞に作用させ、RAW 細胞の培養上清により刺激を行った際には、*Ikke* 遺伝子の発現量に変化は認められないことから(データ非掲載)、脂肪細胞の *Ikke* の発現上昇は、脂肪組織へ浸潤したマクロファージが放出する生理活性物質によって誘導されと考えられ、B6 摂取による *Ikke* 遺伝子の発現量の低下は、脂肪組織へのマクロファージの浸潤量が減少することが要因であると考えられた。さらには、*in vitro* におけるマクロファージと脂肪細胞との共存培養によって、両者は TNF- $\alpha$  や FFAs の分泌を介して相互に活性化する *paracrine loop* を形成することが示されている[68,69,73,104]。本研究では、脂肪組織へ浸潤するマクロファージによって放出される代表的な因子である TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  刺激によって脂肪細胞における *Ikke* 発現量が有意に増加することを明らかにした。以前、ヒト IKK $\epsilon$  遺伝子のプロモーター領域に

おける発現機構の解析がなされ、プロモーター領域内に NF- $\kappa$ B の結合が想定される配列が見出されており、ヒトの脂肪細胞においても NF- $\kappa$ B の活性化によって *IKK $\epsilon$*  の遺伝子発現が誘導されている可能性が示された[105]。本章において、マウスの肥満脂肪組織における *Ikke*mRNA の発現量と *Tnf- $\alpha$*  および *Il-1 $\beta$*  mRNA の発現量は、正に相関することを明らかにしたことから、脂肪細胞において発現が増加する *Ikke* は、脂肪組織へ浸潤したマクロファージの放出する TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  によって誘導されることが示唆された。TNF- $\alpha$  は、その受容体である tumor necrosis factor receptor (TNFR) を介して下流の NF- $\kappa$ B シグナルを増強することが知られており、また IL-1 $\beta$  も、interleukin 1 receptor (IL-1R) を介して下流の NF- $\kappa$ B シグナルを増強すると考えられる。一方で、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  刺激による *Ikke* の発現の増加と比較して、活性化した RAW 細胞の培養上清による刺激によって *Ikke* の発現は著しく誘導されたことから、*IKK $\epsilon$*  の発現の増加は、下流の NF- $\kappa$ B および IRF シグナルの活性化を介して標的遺伝子である炎症性サイトカインの産生を増加させ、それらが autocrine 的に脂肪細胞に作用して *Ikke* の発現をさらに増加させる正のフィードバック機構が働いていることが想定された。極めて最近では、マクロファージにおいて NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームの活性化を介して成熟し、分泌される IL-1 $\beta$  が、脂肪細胞に作用してインスリンシグナルを阻害し、糖の取り込みを減少させることが報告された[72,106]。マクロファージの浸潤による病態発症において、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  を介する脂肪細胞の NF- $\kappa$ B シグナルの活性化によって、*Ikke* の発現が増加し、インスリン感受性の低下や、炎症性サイトカインの産生量の増加を引き起こし、脂肪組織の慢性炎症や全身の代謝異常に関与する重要な役割を担う可能性が示された。また、脂肪細胞のみならず、肝細胞に *IKK $\epsilon$*  を過剰発現させることによって肝臓において炎症性サイトカインの産生が増加し、肝細胞のインスリン感受性は著しく低下する[97]。肝臓には組織常在マクロファージである Kupffer cell が豊富に存在しており、高脂肪食負荷によって活性化される Kupffer cell との相互作用によって肝細胞の *Ikke* が発現誘導されると考えられた。また、*IKK $\epsilon$*  は、自然免疫反応において重要である I $\kappa$ B kinase family に属する炎症性因子として同定され、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  のみならず、微生物産物や、IL-6 などのサイトカイン、植物由来の diterpene の一種である phorbol ester などにおいても発現誘導されることが示され[93,107]、脂肪組織において様々な炎症シグナルに応答して慢性炎症の発症や発展に関与する重要な役割を担うことが想定された。

本研究では、脂肪組織内へと浸潤するマクロファージとの相互作用によって *in vivo* の脂肪細胞において発現増加するシグナル伝達因子として *Ikke* を同定した。自然免疫反応における *Ikke* の役割に加え、脂肪組織に浸潤したマクロファージによって成熟脂肪細胞において *Ikke* の発現が増加することで、脂肪組織の慢性炎症の発症やインスリン抵抗性など全身の代謝異常に関与する可能性が示された。本研究によって、肥満の病態発症において脂肪組織へ浸潤するマクロファージの病態的意義について新しい洞察

が得られたとともに、*Ikkε* の発現解析や脂肪細胞における生理機能を明らかにすることで他の炎症性疾患の発症原因としての *Ikkε* の役割の理解にもつながると考えられた。

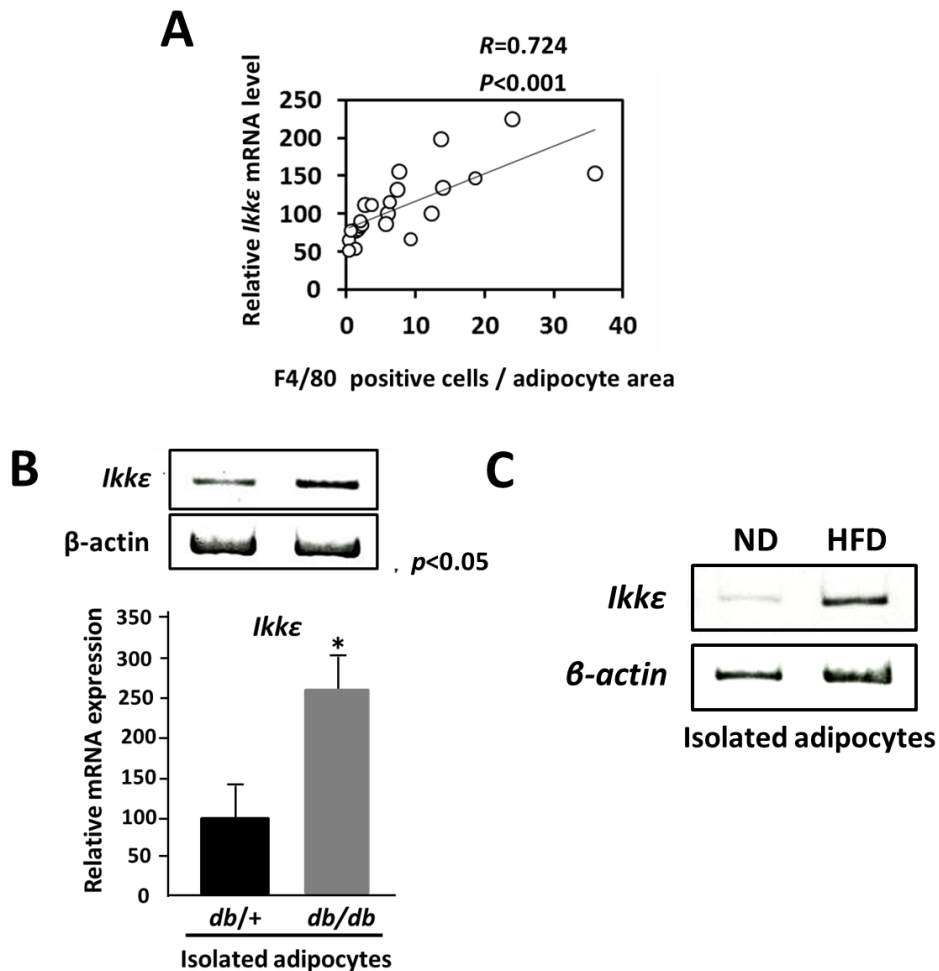
2-5. 図表



**Fig.7** マウス精巣周囲白色脂肪組織における *Ikke* の発現解析

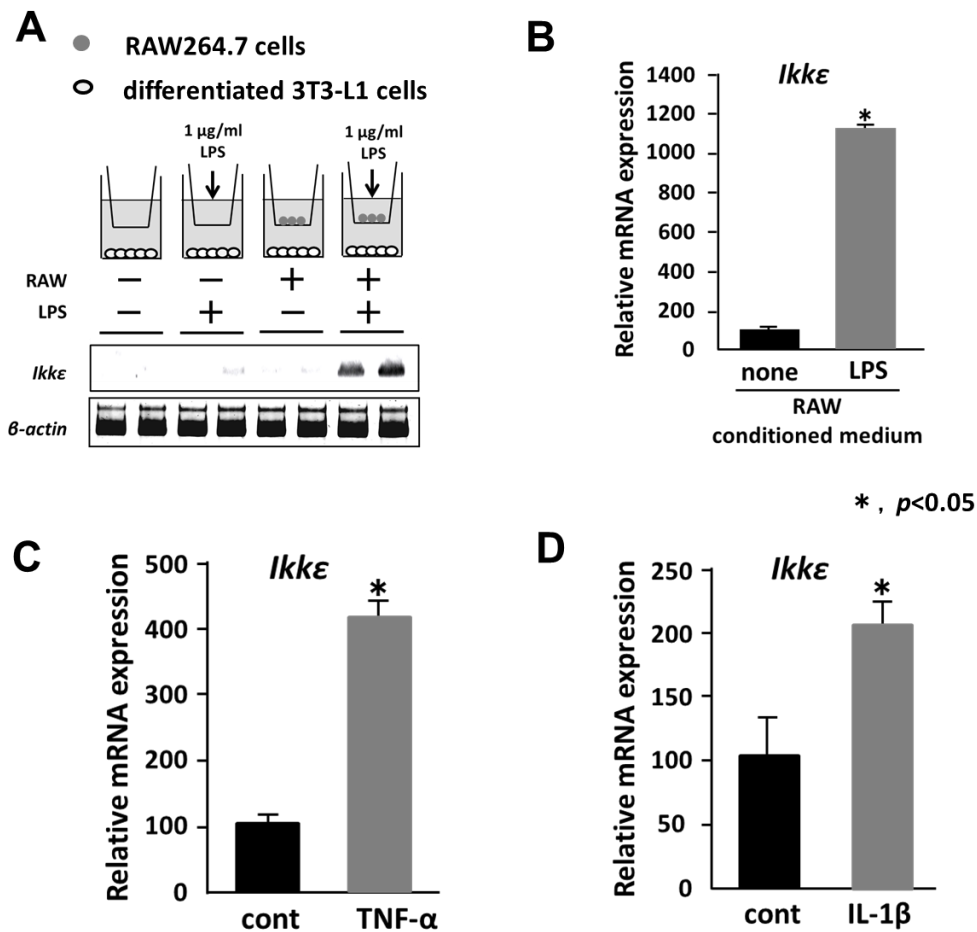
遺伝性肥満 *db/db* マウスおよび野生型マウスの白色脂肪組織における *Ikke* の発現量を real-time PCR 法にて解析した (A)。野生型 C57/BL マウスを、通常食 AIN93G を与えた ND 群または高脂肪食を与え肥満を誘導した HFD 群の 2 群に分け、16 週間飼育した後、精巣周囲白色脂肪組織の total RNA を抽出し、*Ikke* の発現量を real-time PCR 法にて解析した (B)。1 mg/kg vitamin B6、および 35 mg/kg vitamin B6 摂取マウスの白色脂肪組織における *Ikke mRNA* の発現解析の結果、35 mg/kg の B6 を摂取させたマウス (n=12) において *Ikke mRNA* の有意な発現量の低下を示した (C)。





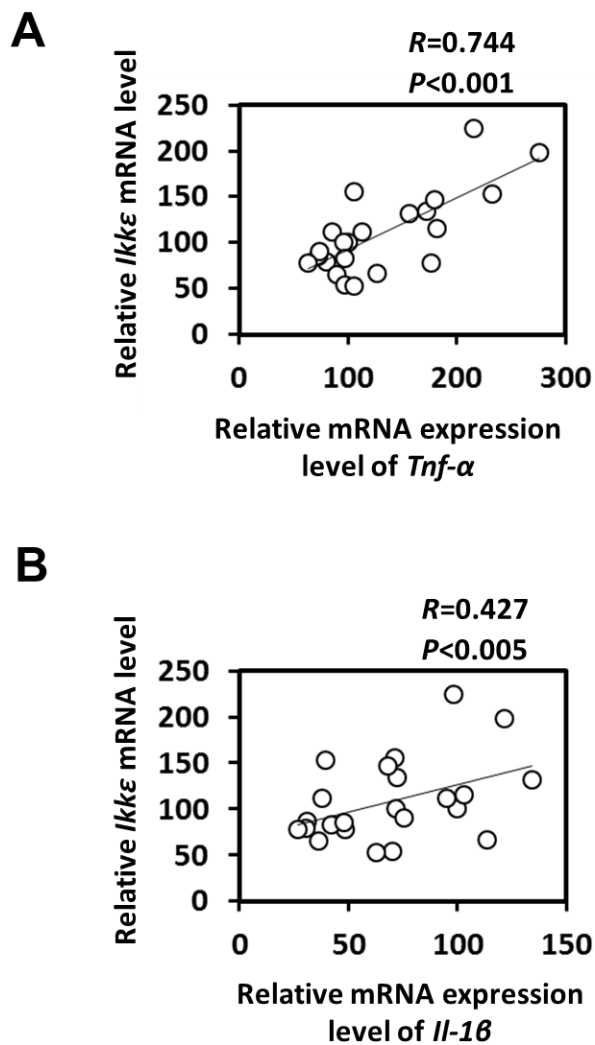
**Fig.8** 白色脂肪組織における *Ikke* 発現量とマクロファージ浸潤量との比較解析および成熟脂肪細胞における *Ikke* の発現解析

real-time PCR 法によって肥満脂肪組織の *Ikke* の発現量を定量し、一方でマクロファージのマーカーである F4/80 抗体を用いた組織免疫染色によってマクロファージ数を数値化した。両指標の相関の有無を Pearson の積率相関分析を用いて解析した (A)。collagenase による酵素分散を用いて *db/+*、および *db/db* マウスの白色脂肪組織から成熟脂肪細胞画分を単離し、*Ikke* の発現量を RT-PCR および real-time PCR 法によって解析した (B)。同様に、酵素分散によって通常食摂取マウスおよび高脂肪食摂取マウスの白色脂肪組織から成熟脂肪細胞画分を単離し、RT-PCR 法によって *Ikke* mRNA の発現を解析した (C)。



**Fig.9** RAW264.7 細胞と共存培養を行った 3T3-L1 脂肪細胞における *Ikke* の発現解析

共存培養系は第 1 章で確立した方法に準じて行った。RAW 細胞への LPS 添加後、24 時間共存培養した 3T3-L1 脂肪細胞の mRNA を抽出し、発現解析に供した。*Ikke* の発現量を RT-PCR 法によって解析した結果、活性化マクロファージと共存培養した 3T3-L1 細胞において *Ikke mRNA* の著しい発現の増加が認められた (A)。成熟させた 3T3-L1 細胞を LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 刺激によって活性化した RAW 細胞の培養上清または LPS 刺激をしていない RAW 細胞の培養上清 (none) で 18 時間刺激した際の *Ikke* の発現量を real-time PCR 法にて解析した (B)。成熟させた 3T3-L1 細胞に TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) または IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) で 24 時間刺激後の mRNA を抽出し、*Ikke* の発現量を real-time PCR 法にて解析した (C, D)



**Fig.10** 脂肪組織の *Ikke* mRNA 発現量と *Tnf- $\alpha$*  および *Il-1 $\beta$*  の mRNA 発現量との比較解析

各マウス個体における *Tnf- $\alpha$*  および *Il-1 $\beta$*  の mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量した。さらには、*Ikke* の mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量し、*Tnf- $\alpha$*  および *Il-1 $\beta$*  の mRNA 発現量と *Ikke* の発現量の相関の有無を Pearson の積率相関分析を用いて解析した (A, B)。

## 第3章 マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現低下する *Rassf6* の単離

### 3-1. 序論

メタボリックシンドローム発症の基盤となる病態として、白色脂肪組織の持続的な軽微慢性炎症が注目されている[19]。特に、Weisberg らが肥満脂肪組織内へのマクロファージの浸潤量の増加がインスリン抵抗性などの病態発症に大きく関与すると報告して以来[25]、マクロファージと脂肪細胞との相互作用が極めて重要な慢性炎症シグナルとして捉えられている。これまでに、脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用による NF- $\kappa$ B の活性化を介した両細胞の病態的な paracrine loop が、脂肪細胞からの炎症性サイトカインの産生量を増加させ、脂肪組織の慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性など全身性の代謝異常を誘発することが明らかにされた[68]。一方で、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において逆に機能が低下する（発現量が減少する）ことで肥満の病態発症に関与する因子の存在も考えられるが、現在までには全く明らかにされていない。

肥満の進行に従って発現が低下する脂肪細胞因子としては、adiponectin や adipsin (complement factor D) が従来から知られている。本研究で行った遺伝性肥満モデル *db/db* マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現変動の網羅的な解析においても、*adiponectin*、および *adipsin* の発現量はそれぞれ 1/3、または 1/50 にまで低下していた。両遺伝子とも成熟した脂肪細胞から大量に産生される代表的な adipocytokine をコードしているが、最近では、脂肪細胞から分泌される adipsin が、serine protease として C3a 補体ペプチドの活性化に関与することが明らかにされ、インスリンの分泌を担う膵  $\beta$  細胞の正常な機能の維持にとって必須な因子であることが報告された[108]。一方で、adiponectin は、脂肪細胞が特異的に産生する善玉の adipocytokine として古くから知られているが、肥満度と相関して TNF- $\alpha$  などの炎症性のサイトカインは正の相関を示す一方で、adiponectin は負の相関を示すことが見出された。正常な脂肪細胞から豊富に産生される adiponectin は、肥満脂肪組織の慢性炎症に対して抗炎症効果を示し、さらには、adiponectin 欠損マウスや遺伝的肥満マウスの耐糖能の悪化は、アデノウイルス法を用いた adiponectin の投与によって改善することも報告されている[15,18]。マウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞における adiponectin の発現量はマウスマクロファージ RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) との共存培養によって低下することが示され[68]、脂肪組織内へのマクロファージの浸潤によって、マクロファージの放出する TNF- $\alpha$  などの炎症性メディエーターが脂肪細胞に作用することで adiponectin の発現量を低下させている可能性が強く示唆されている。adiponectin や adipsin のように、肥満に伴って脂肪細胞において発現量が低下することで肥満の病態発症に深く関与する因子の存在が示唆されているが、肥満に伴い脂肪細胞において発現量が低下する他の因子に

関する報告は極めて少ない。一方、脂肪組織のマクロファージを特異的に欠損させた CD11c-DTR マウスに高脂肪食飼料を負荷し、肥満を誘導した際の脂肪組織では、野生型マウスの脂肪組織と比較してマクロファージの浸潤数が著しく減少しているが、血中の adiponectin 濃度に変化は認められなかったことから[30]、adiponectin の発現低下を示した *in vitro* の実験結果は、培養細胞を用いた手法であるため、必ずしも *in vivo* での病態現象を反映はしていないことを示唆するものである。以上のように、マクロファージの浸潤に応答して *in vivo* における脂肪細胞での発現が低下する因子は明らかにされていない。脂肪細胞において機能が低下することで肥満の病態発症に関与する新規の脂肪細胞由来の因子の存在が明らかになれば、肥満治療における新しい治療標的として提案できるとともに、脂肪組織内に浸潤するマクロファージの病態的役割について新たな解釈になるものとして期待される。

第 1 章、および第 2 章において、肥満脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の脂肪細胞に及ぼす影響を解析し、マクロファージの脂肪組織への浸潤に基づいた軽微な慢性炎症や代謝異常の成因となる *in vivo* の脂肪細胞由来遺伝子群の単離を試みた。既に、マクロファージと脂肪細胞との相互作用によって、脂肪細胞において発現量が増加する遺伝子として、*Ptx3* や *Ikke* を同定するなど、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連して脂肪細胞において発現量が変動する *in vivo* の遺伝子を単離する独自の手法であることを示すものである。そこで、第 1 章において確立したマクロファージとの相互作用によって *in vivo* の脂肪細胞において発現量が増加する因子を単離する手法を応用することで、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において逆に機能が低下する（発現量が減少する）ことで慢性炎症などの肥満病態の発症に関与する重要な脂肪細胞由来の因子の単離も可能であると考えた。本章では、*in vivo* の肥満脂肪組織においてマクロファージの浸潤に関連して発現量が低下する候補遺伝子として 18 遺伝子を単離し、さらには、*in vitro* において RAW 細胞と共存培養を行った脂肪細胞における詳細な発現解析を実施し、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において最も発現量が低下する因子であり、かつ機能が失われることで肥満の病態発症において重要な意義をもつと考えられる候補因子として、*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6 (Rassf6)* を単離し、脂肪組織における生理的機能の解明に取り組んだ。

## 3-2. 研究材料および実験手法

### 3-2-1. 一般試薬

一般試薬には主に nacalai tesque、Sigma の特級試薬を用いて行い、本章で使用した試薬の一部は略号に記載したように簡略化した。

### 3-2-2. polyacrylamide gel 電気泳動

1-2-2. polyacrylamide gel 電気泳動の項に記載した方法に従って行った。

### 3-2-3. 動物飼育

本研究で行う動物実験は、広島大学動物実験委員会において実験の手順、および方法について広島大学承認番号 C11-23 において承諾を得た後、関連する法令等を遵守しながら遂行している。

#### dbldb マウスの飼育

6 週齢の雄性 *dbldb* (+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) マウス、およびコントロールとして雄性 *db/+* (+Dock7<sup>m</sup>/+Lepr<sup>db</sup>) マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。1-2-3. dbldb マウスの項に記載した飼育方法に準じて行った。

#### oblob マウスの飼育

14 週齢の雄性 *oblob* (Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>) マウス、およびコントロールとして雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル(8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で、脱イオン水と固形飼料を自由摂取させ、飼育を行った。

#### C57BL/6J マウスの飼育

5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル(8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24±1°C) で飼育を行った。馴化期間として、購入後 1 週間は水と固形飼料を自由摂取させ、実験に用いた。6 週齢以降、実験食として脂肪分 60% (カロリー比) を含む高脂肪飼料 HFD-60 を 8 週間、または 16 週間与えた。コントロール(ND)マウスは 6 週齢以降、通常食 AIN-93G を自由摂取させた。

### 3-2-4. 白色脂肪組織の抽出および total RNA の抽出

絶食 5 時間後に精巣周囲の白色脂肪組織を抽出した。抽出した脂肪組織重量を測定し、15 ml 容チューブに分注した QIAZOL reagent (Qiagen) 2 ml に加え、ホモジナイ

ザーで完全に破碎し、30 分間室温にて静置した後、total RNA の調製まで-80°C で保存した。脂肪組織からの total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit(Qiagen) を用いて **1-2-4. 白色脂肪組織の摘出および total RNA の抽出**の項に準じて行った。

### **3-2-5. 酵素分散法による成熟脂肪細胞と SVF の分離**

#### **collagenase type I 溶液の調製**

collagenase type I (worthington 社製)を PBS(-)で 1 mg/ml となるように調製し、collagenase type I 溶液として使用した。

#### **成熟脂肪細胞画分と stromal vascular fraction (SVF) の分離**

通常食摂取または高脂肪食を 16 週間摂取させた C57BL マウスの脂肪組織 300 mg を 60 mm / dish に入れ、ハサミと手術用メスで細切後 50 ml 容チューブに入れ、15 ml の collagenase Type I 溶液/に浸した後、37°C で 30 分間振とうした(stroke 88/min)。その後、**1-2-6. 成熟脂肪細胞画分と stromal vascular fraction (SVF) の分離**の項に準じて成熟脂肪細胞画分と SVF を分離した。それぞれの画分からの total RNA の調製は、**1-2-6. total RNA の調製**の項に準じて行った。

### **3-2-6. RT-PCR 解析**

#### **逆転写反応による cDNA の合成**

逆転写反応に用いる total RNA は、**3-2-4.**の項で抽出した組織からの total RNA (500 ng 相当) および **3-2-5.** 成熟脂肪細胞と SVF 画分からの total RNA (80 ng および 50 ng) を使用した。ReverTra Ace RT (TOYOBO 社製)を用いて **1-2-7. 逆転写反応による cDNA の合成**の項に準じて cDNA 合成を行った。合成した cDNA を用いて、Go-Taq DNA polymerase (Promega 社製)、による PCR 反応を行い、反応終了後には、5% PAGE で電気泳動を行った。電気泳動は 1×TBE の泳動 buffer を用い、200V の定電圧で 40 分間の条件で行った。電気泳動終了後、gel を ethidium bromide 溶液に浸し、UV 照射により増幅 DNA のバンドのパターンを確認した。

以下に PCR 反応の手順を記す。

PCR 反応は 1 サンプルあたり以下の反応スケールでサンプルを調製した。

#### **Go-Taq Green master mix (20 µl scale)**

Green master mix	10.0 µl
Nuclease free water	8.0 µl
cDNA	1.0 µl
sense primer	0.5 µl

antisense primer 0.5  $\mu$ l

スピンドウンした後、PCR 用 8 連チューブに上記の反応液を加えた。95°C で 2 分間熱処理し、95°C 40 秒間→58°C 40 秒間→72°C 1 分間の条件下で、計 30 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。

本研究で使用した合成 primer は全て 100  $\mu$ M で使用した。下記に使用した合成 primer を記す。

mouse *adiponectin*

sense primer 5'-ATTGTGGAAGCATCCGAGAC-3'

antisense primer 5'-GTAGGAATCCCGCAATGATG-3'

mouse *Raassf6*

sense primer 5'-CAAGCTGGAGATGATGAGA-3',

antisense primer 5'-GGCTGTGAGCTCCACTCCAAG-3'

mouse *Hmga2*

sense primer 5'-AGCAAGAGCCAACCTGTGAG-3',

antisense primer 5'-CGAGGATGTCTCTTCAGTCTCC-3'

mouse *CD44*

sense primer 5'-CCGAGGATTCATCCCAACGC-3',

antisense primer 5'-GCCGCTGCTGACATCGTCAT-3'

*$\beta$ -actin (mouse, human)*

sense primer 5'-TTGGGTATGGAATCCTGTGGCATC-3'

antisense primer 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'

mouse *L-19*

sense primer 5'-GGCATAGGGAAGAGGAAGG-3'

antisense primer 5'-GGATGTGCTCCATGAGGATGC-3'

**3-2-7. real-time PCR による発現解析**

real-time PCR 反応には THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社製) を使用した。primer と鋳型 cDNA は上記の項と同様のものを使用し、反応組成や条件は

**1-2-7. real-time PCR による発現解析** に準じて行った。



### 3-2-8. 培養細胞の培養法

#### 3T3-L1 細胞の継代培養および分化誘導

増殖培地および分化誘導培地 (MDI) は、**1-2-8. 3T3-L1 細胞の継代培養および分化誘導**の項に記載した組成の培地を使用した。また、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞の培養および継代および脂肪細胞への分化誘導は、**1-2-8. 3T3-L1 細胞の継代培養および分化誘導**に準じて行った。

#### RAW264.7 細胞(RAW 細胞)の継代培養、および LPS 刺激

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW 細胞の培養および LPS 刺激、培養上清の回収は、**2-2-7. RAW264.7 細胞(RAW 細胞)の継代培養、および LPS 刺激**の項に記した方法に従って行った。

#### Transwell system を用いた共存培養

Transwell は、Costar 社製のクリアタイプの 12 well cell culture plate を使用し、**2-9 Transwell system を用いた共存培養**に準じて行った。

#### RAW264.7 細胞の培養上清による 3T3-L1 細胞の刺激

12 well culture plate (Costar 社製) に 3T3-L1 細胞を  $8 \times 10^4$  cells/well の条件で播種した。定法にしたがって分化誘導を行い、分化誘導 8 日後 (day8) の成熟脂肪細胞を作製した。**2-2-7. RAW 細胞の培養上清による 3T3-L1 細胞の刺激**の項に記載した方法で刺激を行った。培地交換した時間を 0 時間とし、24 時間後の脂肪細胞からの total RNA 調製を行った。

#### TNF- $\alpha$ による 3T3-L1 細胞の刺激

12 well culture plate (Costar 社製) に 3T3-L1 細胞を  $8 \times 10^4$  cells/dish の条件で播種した。定法により分化誘導を行い、分化誘導 8 日後 (day8) の成熟脂肪細胞を作製した。終濃度 10 ng/ml となるように recombinant mouse TNF-alpha (R&D systems 社製) を DMEM 培地に加え、培地交換を行うことで刺激を行った。無刺激の細胞群は、DMEM 培地に PBS(-) を加え、培地交換を行った。

#### 培養細胞からの total RNA の抽出、および RT-PCR 解析

共存培養 24 時間後、または培養上清による刺激開始 18 時間後の 3T3-L1 細胞の培地を取り除き、QIAzol Reagent を 500  $\mu$ l ずつシャーレに加え、セルスクレーパーで細胞の接着を剥がし、溶液全量を 1.5 ml 容チューブに回収した。TNF- $\alpha$  刺激開始 24 時間後の 3T3-L1 細胞の培地を取り除き、QIAzol Reagent を 500  $\mu$ l ずつシャーレに加

え、セルスクレーパーで細胞の接着を剥がし、溶液全量を 1.5 ml 容チューブに回収した。室温にて 3 分間静置した後、chloroform を 100  $\mu$ l ずつ加え 15 秒間激しく vortex し、さらに 3 分間静置した。その後遠心(12,000 g、4°C、10 分間)を行い、上清を新しい 1.5 ml 容チューブに回収し、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて、推奨プロトコールに準じて total RNA の抽出を行った。回収した RNA 濃度を nano drop 2000 を用いて測定し、1  $\mu$ g 相当の total RNA を用いて **1-2-7. 逆転写反応による cDNA の調製**の項に準じて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

### **3T3-L1 細胞への siRNA 導入による *Rassf6* の発現抑制**

マウス *Rassf6* に対する 2 本鎖 siRNA は、Invitrogen 社製のカスタム設計を用いてデザインし、合成された。sense 5'-AAUGUAAAGAGCGAAAUCCCGAGGG-3'、antisense 5'-CCUCUGGGAUUUCGCUCUUUACAUU-3'の合成 siRNA を使用した。60mm culture dish に 3T3-L1 細胞を  $5 \times 10^5$  cells の条件で播種し、定法に従って成熟脂肪細胞へと分化させた。分化 8 日目の成熟脂肪細胞を trypsin-EDTA 溶液で処理した後、DMEM 培地を 4 ml 加えて細胞を回収し、遠心 (1,200 g、4°C、5 分) した。細胞を十分に懸濁した後、DMEM 培地で希釈して細胞数を血球計測盤にて計数した。*Rassf6* siRNA を終濃度 20 nM となるように Opti-MEM 培地 (gibco 社製) で溶解させ、さらに LipofectAMINE RNAimax (Invitrogen 社製) と混合して室温で 5 分間静置し、siRNA 溶液を調製した。  $8.0 \times 10^4$  cells/ml となるように細胞懸濁液と siRNA 溶液とを混合して reverse transfection 法にて 3T3-L1 細胞に *Rassf6* siRNA を導入し、12 well culture plate の各 well に 1 ml ずつ細胞を播種した。対照群として *luciferase* siRNA を同様の方法で導入した 3T3-L1 細胞を播種した。siRNA を導入して 48 時間後に培地を吸引して除き、400  $\mu$ l の QIAzol Reagent を加え細胞を溶解し、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて total RNA を調製した。**3-2-9. DNA microarray 解析**の項に記した方法で DNA microarray 解析に供し、さらには **1-2-7. 逆転写反応による cDNA の合成**に準じて cDNA を作製した。

### **3-2-9. DNA microarray 解析**

**1-2-5. DNA microarray 解析**の項と同様に、試薬は全て Agilent Technologies 社推奨の試薬を用いて行った。**3-2-8. 3T3-L1 細胞への siRNA 導入による *Rassf6* の発現抑制**の項で *luciferase* siRNA を導入した成熟 3T3-L1 細胞 (Si-luc 群)、および *Rassf6* siRNA を導入した成熟 3T3-L1 細胞 (Si-rassf6 群) 由来の total RNA を解析に供した。回収した total RNA は、EtOH 沈殿を行った後、遠心 (12,000 g、4°C、15 分間) し、上清を除去した後、70% EtOH で洗浄を行った。再度遠心し、上清を除去した後、減圧乾燥させた。RNase free 水を 50  $\mu$ l ずつ添加し、65°C にて 3 分間熱処理して total RNA 溶液とした。nano drop 2000 (Thermo 社製) を用いて RNA 濃度を測定した後、2  $\mu$ g 相当

の total RNA 溶液を群毎 (Si-luc 群、Si-rassf6 群) に pool し、各群由来の total RNA 溶液とし DNA microarray 解析に供した。以後の cDNA の合成、cRNA の標識プローブの合成、cRNA の標識および DNA チップへのハイブリダイゼーションは、**1-2-5. DNA microarray 解析**の項に準じて行った。

### 3-3. 実験結果

#### 3-3-1. 遺伝性肥満 *db/db* マウスの遺伝子発現解析—単球・マクロファージの浸潤に関連して発現低下する因子群の単離

DNA microarray 法を用いて第 1 章で行った遺伝性肥満病態モデル(*db/db*)マウス、およびコントロール(*db/+*)マウスの精巣周囲白色脂肪組織における 2 群間の遺伝子発現変動の解析の結果、*db/db* マウスの白色脂肪組織において mRNA 発現が有意に低下する 1,745 個の遺伝子を単離した。一方、1 mg/kg の B6 摂取群と比較して 35 mg/kg の B6 摂取群の脂肪組織において有意に発現量が増加する 69 個の遺伝子を単離した。両遺伝子発現変動の解析結果を比較分析することによって、*db/db* マウスの肥満の進行に伴い発現量が低下する因子群の中から、マクロファージの浸潤に関連する因子群の選抜を行った (Fig.11)。その結果、*db/db* マウスにおいて 50 %以下にまで発現低下し、かつ高 B6 摂取マウスによって 2 倍以上発現量が増加する因子が 18 個単離され、それら因子群をマクロファージの浸潤に関連して発現が低下する候補遺伝子群とした (Table 3)。18 個の候補遺伝子群には、遺伝子名が不明な遺伝子が 9 個含まれており、さらに多くの遺伝子の脂肪組織における生理機能は未解明であった。

#### 3-3-2. 単球・マクロファージの浸潤に関連して発現が低下する *Rassf6* の単離、および発現解析

DNA microarray 法では偽陽性が出現するため、マウス白色脂肪組織内での発現変動について *db/db* および *db/+* マウス (各群 n=3) の各個体の脂肪組織由来の total RNA を逆転写反応に供し、調製した cDNA を用いて個別に発現の解析を試みた。本研究では、肥満の進行に伴ってその機能が著しく低下する因子の選抜を試み、特に、*db/db* マウスにおいて 1/10 以下にまで発現低下する因子群に着目し、*Cyp2e1*、*Acsn3*、*Rassf6*、*Slc1a3* の 4 遺伝子を単離した。*db/db* マウスの白色脂肪組織の遺伝子発現変動を RT-PCR 法にて解析を行い、*db/db* マウスにおいて個体差なく著しく発現低下する遺伝子として *Rassf6* を選抜した (Fig.12A)。*Rassf6* は肥満時に発現量が 1/10 にまで低下する一方で、B6 摂取によって 2.17 倍の発現の増加を示した。実際に real-time PCR 法を用いて *db/db* および *db/+* マウスの各個体における *Rassf6* mRNA 発現量の解析を行った結果、*db/db* マウスにおいて *Rassf6* mRNA 発現量は 1/10 にまで有意に減少していた (Fig.12B)。また、高脂肪食負荷による食餌誘導性肥満マウスおよび正常食を摂取させた対照群の精巣周囲白色脂肪組織の mRNA を抽出し、real-time PCR 法にて *Rassf6* mRNA 発現量の解析を行った結果、食餌誘導性の肥満マウスの脂肪組織においても *Rassf6* mRNA 発現量は 1/10 にまで有意に低下した (Fig.12C)。一方で、B6 摂取マウスの脂肪組織の cDNA (各群 n=12) を用いた real-time PCR 法による遺伝子解析を実施した結果、B6 摂取量の増加によって *Rassf6* の発現量は 2.5 倍有意に増加した (Fig.12D)。以上の結果から、*Rassf6* は、白色脂肪組織へのマクロファージ浸潤に応答して白色脂肪組織において発現量が低下することが示唆された。脂肪

組織における *Rassf6* の生理的機能についての報告はなく、本研究では、肥満に伴って発現低下した *Rassf6* が発現する細胞種の同定を試みた。白色脂肪組織を酵素処理によって分散し、得られた成熟脂肪細胞画分 (adipocyte) と SVF より total RNA を抽出して各 cDNA を合成した。成熟脂肪細胞特異的に発現するマーカーとして *adiponectin* 遺伝子を用いて、RT-PCR 法によって *Rassf6* の発現解析を行った結果、*Rassf6* の発現は、*adiponectin* と同様に成熟脂肪細胞において発現が認められた (Fig.13A)。また、定法に従って分化誘導薬剤 (MDI) を用いて成熟脂肪細胞へ分化誘導した 3T3-L1 細胞および未分化の 3T3-L1 細胞の各 cDNA を用いて *Rassf6* の発現量を real-time PCR 法によって解析を行った結果、成熟脂肪細胞へと分化した 3T3-L1 細胞特異的に *Rassf6* mRNA は発現していることが明らかになった (Fig.13B)。肥満の進行に伴って発現低下した *Rassf6* は、脂肪組織に浸潤するマクロファージに応答して成熟した脂肪細胞において発現低下する因子であることが示唆された。

### 3-3-3. 脂肪細胞における *Rassf6* の発現に与える活性化マクロファージの影響の検討

マクロファージとの相互作用が脂肪細胞の *Rassf6* の発現に与える影響について、*in vitro* においてマクロファージ RAW 細胞とマウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞との共存培養法を用いて検討した。RAW 細胞と共存培養した 3T3-L1 細胞の cDNA を用いて *Rassf6* の発現量を RT-PCR 法および real-time PCR 法にて解析を行った結果、活性化した RAW 細胞と共存培養した 3T3-L1 細胞において *Rassf6* mRNA 発現量は 50% にまで有意に低下した (Fig.14A)。さらには、LPS 刺激により活性化させたマクロファージの培養上清を添加して刺激を行った 3T3-L1 細胞において、*Rassf6* mRNA 発現量は 20% にまで有意に低下した (Fig.14B)。また、マクロファージ由来の主要な炎症性メディエーターである TNF- $\alpha$  により刺激を行った 3T3-L1 細胞においても *Rassf6* の発現は 50% にまで低下した (Fig.14C)。以上の結果から、LPS 刺激によって活性化した RAW 細胞と共存培養した 3T3-L1 細胞における *Rassf6* の発現低下は、マクロファージの分泌する TNF- $\alpha$  によって部分的に引き起こされていると考えられた。また、白色脂肪組織に浸潤したマクロファージ細胞数と *Rassf6* mRNA の発現量は負の相関を示したことから (Fig.15)、*Rassf6* は成熟した脂肪細胞特異的に発現する因子であり、同発現量の減少は、脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加に伴って引き起こされていると考えられた。

### 3-3-4. 脂肪細胞における *Rassf6* の機能解析

脂肪細胞における *Rassf6* の機能を解析するために、reverse transfection 法により成熟した 3T3-L1 細胞に *Rassf6* siRNA (si-rassf6 群) を導入し、*Rassf6* のノックダウン試験を行った。コントロール群としては *Luciferase* siRNA (si-luc 群) を導入した。siRNA 導入 48 時間後の各細胞より total RNA を抽出し、cDNA を合成した。*Rassf6* siRNA の導入によるノックダウンの効率を確認するために、real-time PCR 法にて *Rassf6* mRNA の発現量の

解析を行った。その結果、si-rassf6 群における *Rassf6* mRNA 発現量は、si-luc 群と比較して 1/8 にまで低下することが明らかになった (**Fig.16A**)。 *Rassf6* の発現低下による脂肪細胞の形質の変化を解析するために、DNA microarray 法を用いて各群間の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。同解析の結果、si-luc 群と比較して *Rassf6* をノックダウンした si-rassf6 群において有意に発現変動する 81 個の遺伝子が同定された。 *Rassf6* のノックダウンによって発現増加する因子群には、近年糖尿病のリスクファクターとして報告された *CD44* や細胞老化との関連性が指摘されている *high mobility group A2(Hmga2)*が含まれていた。 si-rassf6 群および si-luc 群の各 cDNA を用いて個別に遺伝子発現解析を行った結果、 *CD44* と *Hmga2* の両遺伝子の発現量は *Rassf6* の発現低下によってそれぞれ 1.6 倍、および 2.2 倍と有意に増加した (**Fig.16B、C**)。

### 3-4. 考察

内臓脂肪型肥満を背景に持つメタボリックシンドロームは、インスリン抵抗性、2型糖尿病や動脈硬化症などの重篤な疾患群のリスクを上昇させることから重大な社会問題となっており、成因の解明が急がれている。序論において、肥満時の白色脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用が極めて重要な病態シグナルであることを述べたが、*in vivo* の肥満脂肪組織において両細胞の相互作用に基づく病態現象の詳細は明らかにされておらず、特に、マクロファージの浸潤に関連して脂肪細胞において発現が低下する因子の報告はなされていない。本研究では第1章および2章において、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連して *in vivo* の脂肪細胞において発現変動する遺伝子群の選抜法を確立し、脂肪細胞において発現量が増加することで全身の代謝異常や脂肪組織の慢性炎症の発症に関与すると考えられる脂肪細胞由来の遺伝子を単離した。本章では、第1章において構築したマクロファージの浸潤に関連する因子群の抽出方法を応用して、マクロファージの浸潤に関連して脂肪細胞において発現が低下することで病態発症に関わる脂肪細胞由来の因子の単離を試みた。

*db/db* マウスの白色脂肪組織で発現が低下する 1,745 個の遺伝子群の中から、B6 摂取により脂肪組織へのマクロファージの浸潤を抑制した際に、逆に発現量が増加した 69 個の因子群との比較解析を行い、18 個の因子群を選抜した (Table 3)。マクロファージの浸潤に関連する因子群の選抜法に関しては、その妥当性を既に第1章、および第2章で示しており、本章で選抜した 18 個の因子群には、脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連して機能が低下することで病態発症に関与する重要な因子が含まれている可能性が考えられた。本章では、*db/db* マウスの白色脂肪組織で 1/10 にまで著しく発現量が低下し、さらに B6 摂取によって 2.5 倍発現量が増加した *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6 (Rassf6)* を見出し、脂肪組織における生理機能の解明に着手した。*Rassf6* は、成熟脂肪細胞画分において高発現している一方で、SVF、および RAW 細胞における mRNA 発現は確認されず、3T3-L1 細胞を用いた遺伝子発現解析によって、*Rassf6* は、未分化の脂肪細胞では発現は認められなかった一方で、分化した成熟脂肪細胞においてのみ高発現していた。さらに、肥満脂肪組織の *Rassf6* mRNA の発現量と F4/80(+)細胞数には負の相関が認められたことから、*Rassf6* はマクロファージの浸潤によって脂肪細胞において発現量が低下することが示唆された。さらには、活性化した RAW 細胞との共存培養、および活性化マクロファージの培養上清による刺激によって脂肪細胞における *Rassf6* の発現量は有意に低下し、また、マクロファージが放出する主要なメディエーターである TNF- $\alpha$  刺激によっても脂肪細胞における *Rassf6* の発現量は有意に低下したことから、脂肪細胞における *Rassf6* の発現低下の一部分は、脂肪組織に浸潤したマクロファージの放出する TNF- $\alpha$  によって引き起こされていると考えられた。一方で、肥満脂肪組織において発現量が著しく減少する候補遺伝子として同様に単離した *Cyp2e1*, *Acsn3*, *Slc1a3* の 3 遺伝子については、マク

ロファージと共存培養を行った脂肪細胞において発現量の変動が認められなかったことから(データ非掲載)、肥満脂肪組織において観察された著しい発現減少には、マクロファージと脂肪細胞との相互作用による影響ではなく、肥満による他の要因が大きく関係していると考えられた。マクロファージと脂肪細胞との相互作用において、マクロファージの放出する TNF- $\alpha$  が脂肪細胞に作用して MCP-1 など、肥満の病態進行に関わる因子の産生量を増加させることが明らかにされているが、本章において単離した *Rassf6* を含む候補遺伝子についても、マクロファージの放出する TNF- $\alpha$  が発現量の低下に関与している可能性が示され、脂肪細胞において発現が低下するメカニズムの解明が求められた。一方で、機能未知な候補因子も複数単離されており、他の候補遺伝子についても脂肪細胞における詳細な発現解析、および機能解析が必要であると考えられた。

*Rassf6* は、Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (RASSF) の一つであり、2000 年に *Rassf1* が発見されて以来、現在、哺乳動物において *Rassf1* から *Rassf10* まで 10 種類の遺伝子が報告されている[109]。RASAF1-RASSF6 は C 末端付近に RalGDS/AF-6 型の Ras-association (RA) domain および Sav/RASSF/Hippo (SARCH) domain を有し、腫瘍抑制など重要な生理機能が報告されている。一方で、RASSF7-RASSF10 は N 末端に RA domain のみを有する新規の RASSF family 分子であり[110]、各分子における生理的役割は未だに不明である。RASSF1 に関しては、腫瘍抑制因子としてその生理機能が報告されており、近年の報告では、RASSF は細胞周期やアポトーシスの調節において重要な生理作用を有することが明らかにされてきている[111]。RASSF6 は、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞やヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 細胞などの複数の細胞においてアポトーシス誘導を増強することが報告された[112,113]。HeLa 細胞や MCF-7 細胞に RASSF6 を過剰発現させると caspase-3 誘導性の細胞死が引き起こされ、さらに、Ikeda らによって RASSF6 は Hippo-Pathway シグナルの中核の構成因子として、癌細胞のアポトーシスを調節することが報告され[112]、従来から知られている Hippo-pathway の調節経路とは異なる生理作用を有していることが明らかにされた。さらに、腫瘍抑制シグナルである Hippo-Pathway の構成因子として RASSF1 の生理機能が報告されて以来、RASSF の生理作用の低下や発現量の低下と発癌との関連性が示されている[114]。本研究で見出した RASSF6 についても、乳癌や大腸癌、腎臓癌など一般的な固形腫瘍の約 30%~60%において発現量の低下が認められており、多くの癌疾患においてその発現低下率が悪性度のマーカーとして報告されている[109]。以上のように、RASSF6 は、アポトーシスの調節を介して腫瘍の抑制において重要な役割を担うことが明らかにされているが、脂肪組織における RASSF6 を含む RASSF の機能などについては全く報告されていない。本研究では脂肪細胞における RASSF6 の生理機能の解明を試み、*Rassf6* が発現する成熟脂肪細胞 3T3-L1 細胞に *Rassf6* siRNA を導入し、脂肪細胞において *Rassf6* の発現を 1/8 程度にまで低下させた際に与える影響を検討した。*Rassf6* のノックダウンを行った脂肪細胞の遺伝子発現動を DNA



microarray 法による遺伝子発現解析によって検討した結果、*Rassf6* の発現を低下させた 3T3-L1 細胞において癌関連遺伝子である *high mobility group protein A2 (Hmga2)* および *CD44* の発現量が有意に増加することを見出した。*CD44* は、細胞膜を貫通するように存在し、細胞表面上でヒアルロン酸をはじめとする細胞外マトリックスと結合する接着分子であり、リンパ球ホーミングに関わるなど多彩な生理機能を有していることが知られている[115,116]。近年では、*CD44* が癌幹細胞に高発現しており、抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) の合成材料であるシスチンを細胞内に取り込み、GSH の細胞内濃度を上昇させ、活性酸素によって誘導される細胞死に耐性をもつ性質を獲得することで、癌幹細胞の増殖や転移を促進することが見出された[117]。本研究において、*Rassf6* の発現低下によって成熟脂肪細胞において *CD44* が発現増加することを見出したが、*CD44* は脂肪細胞の細胞表面に高発現し、肥満に伴って脂肪組織内に過剰に構成される細胞外マトリックスと相互作用することが想定され、肥満の病態発症に関与している可能性が示唆された。さらには、細胞表面に高発現する *CD44* は、肥満脂肪組織内における脂肪細胞の細胞死を負に制御することで細胞生存、すなわち細胞数の増加に関与することで、肥満の病態発症に関わる可能性が考えられ、さらなる詳細な機能解析が求められた。一方で、*HMGA2* は、DNA の結合領域を有する architectural transcription factors の一つであり、癌組織の病態形成や癌細胞の増殖に関与していることが明らかにされている[118]。また、*HMGA2* は多能性幹細胞に高発現しており、細胞分化を調節していることが示され、主に micro RNA let7 や bone morphogenetic protein 4 (BMP4) によって発現が調節されていることが明らかにされた[119,120]。一方で、*HMGA2* は、幹細胞の増殖に関わるのみならず、過剰な *HMGA2* の発現は、脂肪肉腫 (lipoma) の発症に関連することが示され[121]、*Rassf6* の低下で発現が亢進する *Hmga2* は、脂肪細胞内において細胞増殖や脱分化に関わる可能性が示された。肥満脂肪組織における *CD44* と *Hmga2* の遺伝子発現は、*db/db* マウスの脂肪組織において発現量が増加するとともに、高脂肪食を 16 週間摂取させた食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織においてもその発現量は有意に増加することを明らかにした (データ非掲載)。肥満脂肪組織においてマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において著しく発現が低下する *Rassf6* は、脂肪細胞における *CD44* と *Hmga2* の発現を亢進させることで、肥満の進行に伴う脂肪細胞の増殖や分化を制御しているのみならず、Hippo-pathway とは独立した機構で脂肪細胞のアポトーシスを抑制し、細胞生存、さらに細胞寿命の延長を引き起こす可能性も考えられ、本研究によって、マクロファージと脂肪細胞との相互作用が肥満脂肪組織における脂肪細胞の数の制御に影響するという新たな概念が示唆された。一方で、肥満に伴って脂肪組織において Hippo-pathway シグナルの破綻が生じる報告例はなく、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において Hippo-pathway シグナルの構成因子である *Rassf6* が減少することは、肥満と Hippo-pathway シグナルとの関連性を示唆するものであり、今後の解析が期待される。

極めて最近では、糖尿病の遺伝素因の探索を網羅的に行った **Expression-based genome-wide association study (eGWAS)** によって、**CD44** が糖尿病の重大なリスクファクターとして報告されるなど[122]、**CD44** が肥満の病態発症において重要な役割を担うことが示唆され、脂肪細胞における *Rassf6* の機能低下は、**CD44** の発現増加を介してインスリン抵抗性などの病態発症に関与する一面を有すると考えられた。さらには **Sadoshima** らによって、*Rassf1A* 遺伝子の欠損 (**RASSF1A-KO**) マウスの心臓において **TNF- $\alpha$**  の産生が増加し、繊維芽細胞の異常な増殖を引き起こすことで、線維化を促進していることが見出された。実際に、**RASSF1A-KO** マウスに **TNF- $\alpha$**  の中和抗体を投与することで、*Rassf1A* の欠損によって生じた線維化などが有意に抑制されることが示され[123]、**RASSF** が **TNF- $\alpha$**  シグナル経路の活性化を調節することで炎症反応に関与していることが報告された。**RASSF6** は、ヒト肺がん細胞 **A549** 細胞において **NF- $\kappa$ B** 活性化を抑制することが報告されており [109]、マクロファージの浸潤に関連して脂肪細胞において **RASSF6** の機能が低下することは、**NF- $\kappa$ B** 経路の活性化を介して炎症性サイトカインの産生量を増加させ、脂肪組織の慢性炎症の発症において重要な役割を担っている可能性が示唆された。本研究で単離した *Rassf6* は、脂肪組織の脂肪細胞の数の制御や炎症反応を調節していると想定され、肥満に伴って脂肪細胞において機能が失われることで肥満の病態発症に関与する遺伝子であり、特に、マクロファージとの相互作用によって発現が低下すると考えられた。さらには、本章で単離した候補遺伝子群には機能未知な因子が多数含まれていることから、報告例の少なかった脂肪細胞において機能が低下することで病態発症に関わる新規の脂肪細胞由来の遺伝子の発見が可能であり、さらには、脂肪組織内へ浸潤するマクロファージの病態的意義について新たな解釈につながる貴重な研究成果であると考えられた。

3-5. 図表

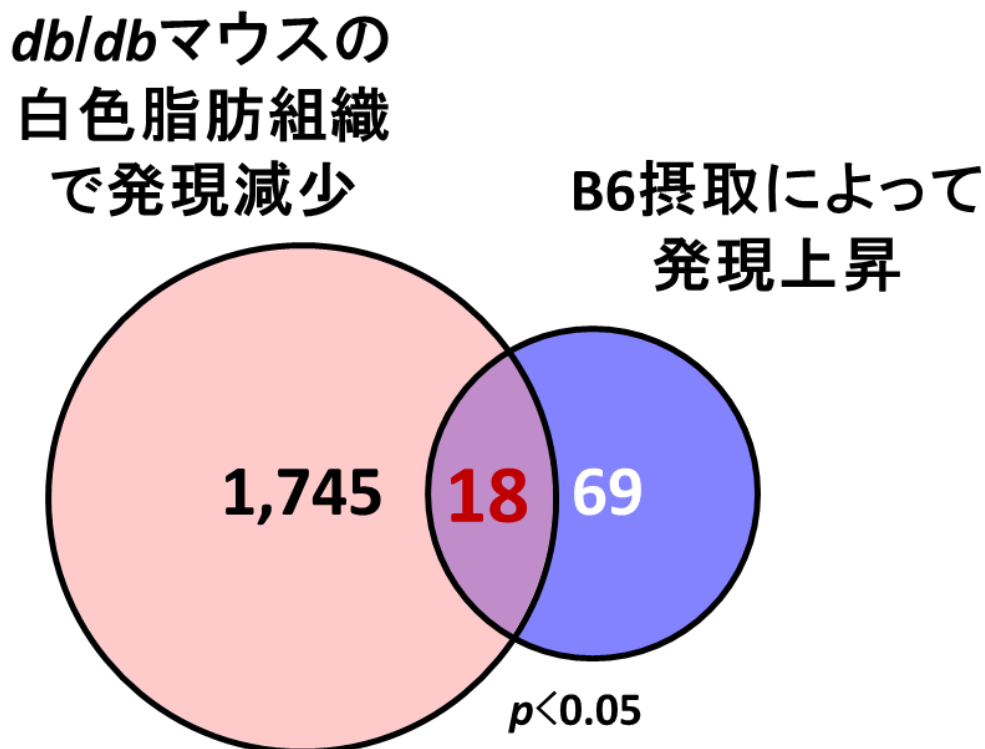


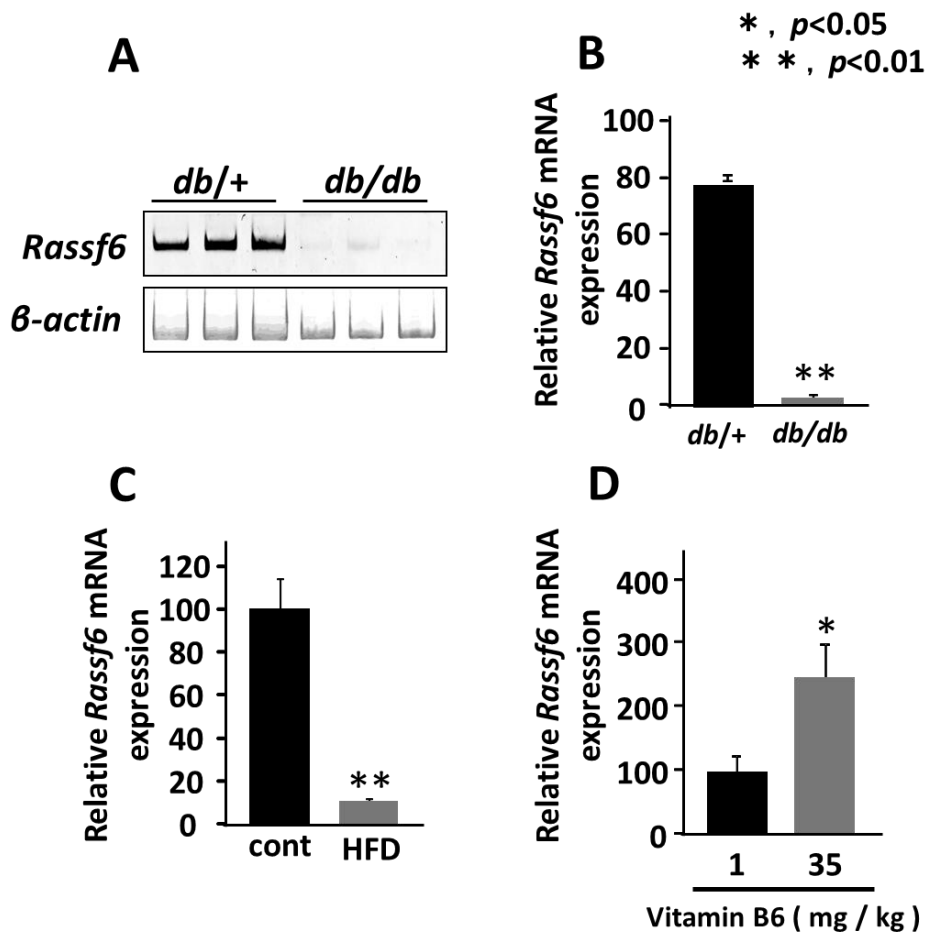
Fig.11 *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現低下する因子群と B6 摂取によって発現上昇する因子群との比較解析

遺伝性肥満 *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現減少した 1,745 遺伝子と B6 摂取マウスの白色脂肪組織において発現上昇した 69 遺伝子との比較解析によって 18 個の因子群を選抜した。

Gene ID	Gene symbol	Gene description	db/db Fold	B6 Fold
NM_153574	D430015B01Rik	RIKEN cDNA D430015B01 gene	0.15	3.70
NM_008506	Mycl1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1	0.35	2.73
XM_130987	Rarres1	retinoic acid receptor responder 1	0.42	2.52
AK046688	Slc1a3	RIKEN full-length enriched library, clone:B430312B09	0.09	2.33
NM_144930	AU018778	expressed sequence AU018778	0.16	2.29
AK008551	2010309G21Rik	RIKEN full-length enriched library, clone:2010309G21	0.38	2.25
NM_028478	Rassf6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6	0.10	2.17
AK0_30641	AK030641	RIKEN full-length enriched library, clone:5330440N21	0.46	2.15
NM_212441	Acsm3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	0.05	2.11
NM_178758	C730027J19Rik	RIKEN cDNA C730027J19 gene	0.13	2.05
NM_145564	Fbxo21	F-box protein 21	0.23	2.03
NM_177820	9130218O11Rik	RIKEN cDNA 9130218O11 gene	0.31	2.02
AF208109	Il17rb	IL-17 receptor homolog short isoform precursor	0.28	2.01
A_51_P250217	A_51_P250217	unknown	0.17	2.00
ENSMUST00	EG434026	Immunoglobulin Kappa light chain V gene segment	0.18	2.00
NM_021282	Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	0.06	2.00
NM_153584	BC031353	cDNA sequence BC031353	0.45	2.00
AK037870	AK037870	RIKEN full-length enriched library, clone:A130057H05	0.33	2.00

**Table 3.** *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現低下し B6 摂取によって発現上昇する因子群

Fig. 11 で単離された因子群 18 個の遺伝子発現変動を示す。赤色はコントロールマウス *db/+* と比較して *db/db* において発現低下（倍率）を、青色は高容量の B6 摂取によって発現量の上昇（倍率）を示している。機能未知な遺伝子が複数含まれており、特に *db/db* マウスにおいて 1/10 以下にまで発現が低下し、細胞死や細胞増殖に関わる *Rassf6* に着目した。



**Fig.12** 単離された *Rassf6* のマウス白色脂肪組織における mRNA 発現解析

コントロールマウス *db/+*、および肥満 *db/db* マウスの白色脂肪組織における、*Rassf6* の mRNA 発現を RT-PCR 法によって解析した結果、*db/db* マウスの白色脂肪組織において *Rassf6* の発現量は著しく低下した (A)。real-time PCR 解析によって *Rassf6* の発現量は 1/10 にまで低下することを示した (B)。また高脂肪食を負荷した食餌性肥満マウス (HFD マウス) における *Rassf6* の発現量を real-time PCR 法を用いて解析を行なった結果、通常食摂取マウスと比較して HFD マウスの白色脂肪組織において *Rassf6* の発現量は 1/10 にまで有意に低下した (C)。さらに、B6 摂取マウスの白色脂肪組織における *Rassf6* の発現量を real-time PCR 法にて解析した結果、高 B6 摂取群において発現量は、2.5 倍有意に増加した。(D)

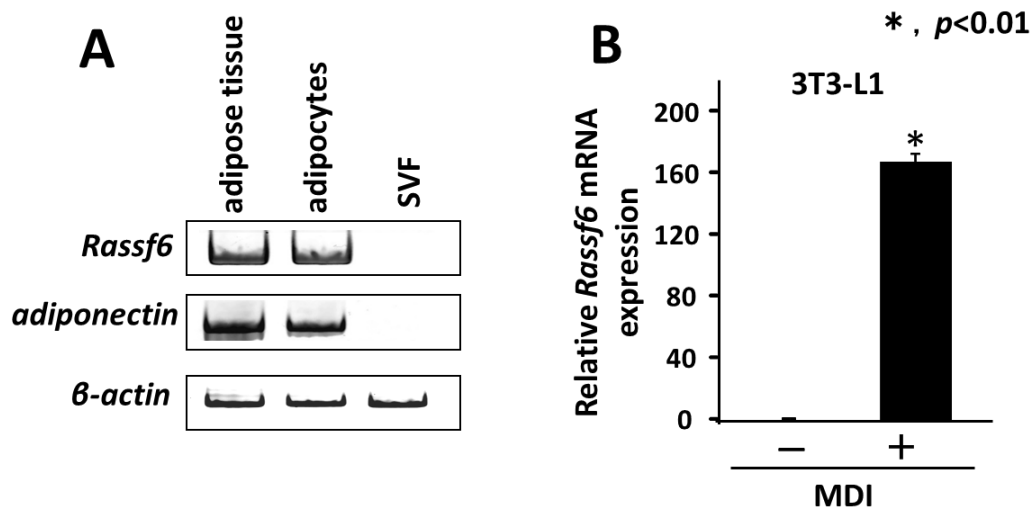
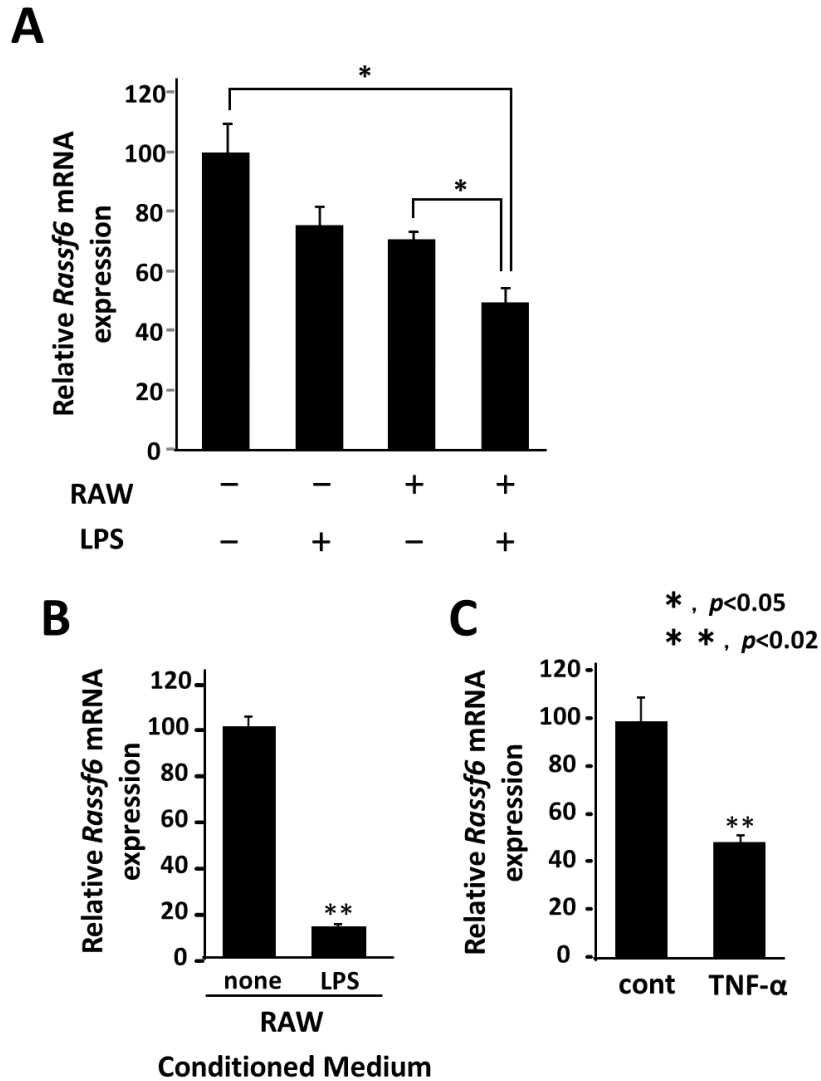


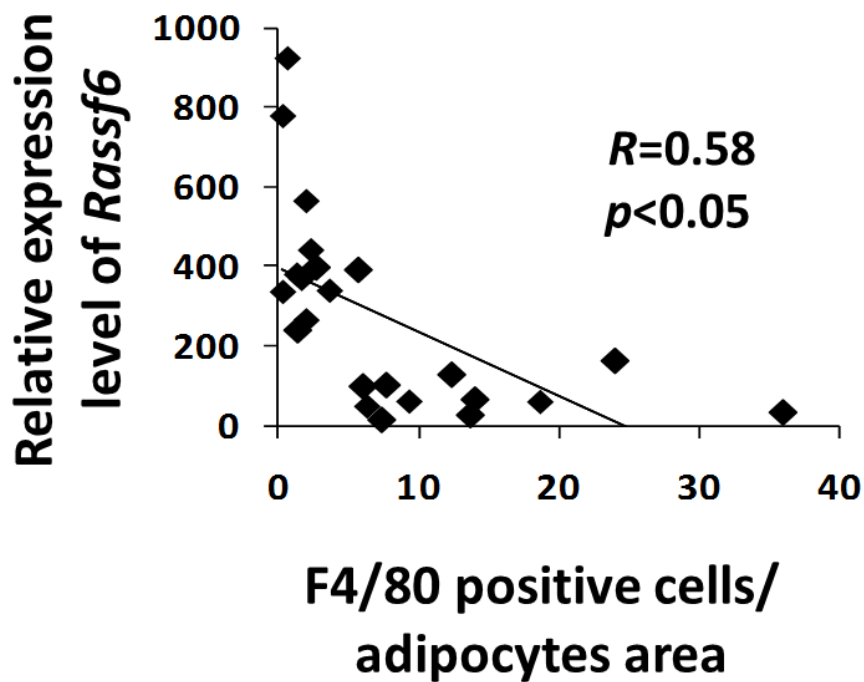
Fig.13 成熟脂肪細胞画分および SVF における *Rassf6* の発現解析

食餌性肥満マウスの白色脂肪組織を、酵素分散法を用いて成熟脂肪細胞画分と SVF (stromal vascular fraction) とに分画し、RT-PCR 法を用いて *Rassf6* mRNA の発現を解析した。成熟脂肪細胞の特異的な分子マーカーとして *adiponectin* 遺伝子を用いた。*Rassf6* は、*adiponectin* と同様の発現パターンを示し、成熟脂肪細胞画分に特異的な発現を確認した (A)。また、3T3-L1 細胞を定法である分化誘導薬剤 (MDI) を用いて成熟脂肪細胞へと分化させた際の 3T3-L1 細胞の cDNA を用いた *Rassf6* の mRNA 発現量を real-time PCR 法によって解析を行った結果、MDI により成熟脂肪細胞へと分化した 3T3-L1 細胞において特異的な *Rassf6* mRNA の発現を認めた (B)。



**Fig.14** マクロファージとの共存培養を行った脂肪細胞における *Rassf6* の発現解析

transwell を用いた共存培養を行い (Fig. 4)、各区の 3T3-L1 細胞由来の cDNA を用いて *Rassf6* mRNA の発現量の定量解析を行った。活性化した RAW 細胞と共存培養した 3T3-L1 細胞において *Rassf6* mRNA の発現量は 50%まで有意に低下した (A)。また、LPS 刺激により活性化した RAW 細胞の培養上清を添加した 3T3-L1 細胞において *Rassf6* mRNA の発現量は 20%にまで有意に低下した。さらに炎症性メディエーターである TNF- $\alpha$  を、終濃度 10 ng/ml の条件で刺激した 3T3-L1 細胞における *Rassf6* mRNA の発現量は 50%以上有意に低下した (D)。



**Fig. 15** 肥満脂肪組織におけるマクロファージ細胞数と *Rassf6* の発現量との比較解析

白色脂肪組織に浸潤した単球・マクロファージ細胞数をマクロファージのマーカーである F4/80 抗体を用いて免疫染色法により解析し、数値化した。さらに、脂肪組織内の *Rassf6* の発現量を real-time PCR 解析によって数値化し、各個体のマクロファージ浸潤量と *Rassf6* の発現量との相関の有無を Pearson の積率相関分析を用いて解析した。その結果、マクロファージの浸潤数と *Rassf6* の発現量は負の相関を示した。



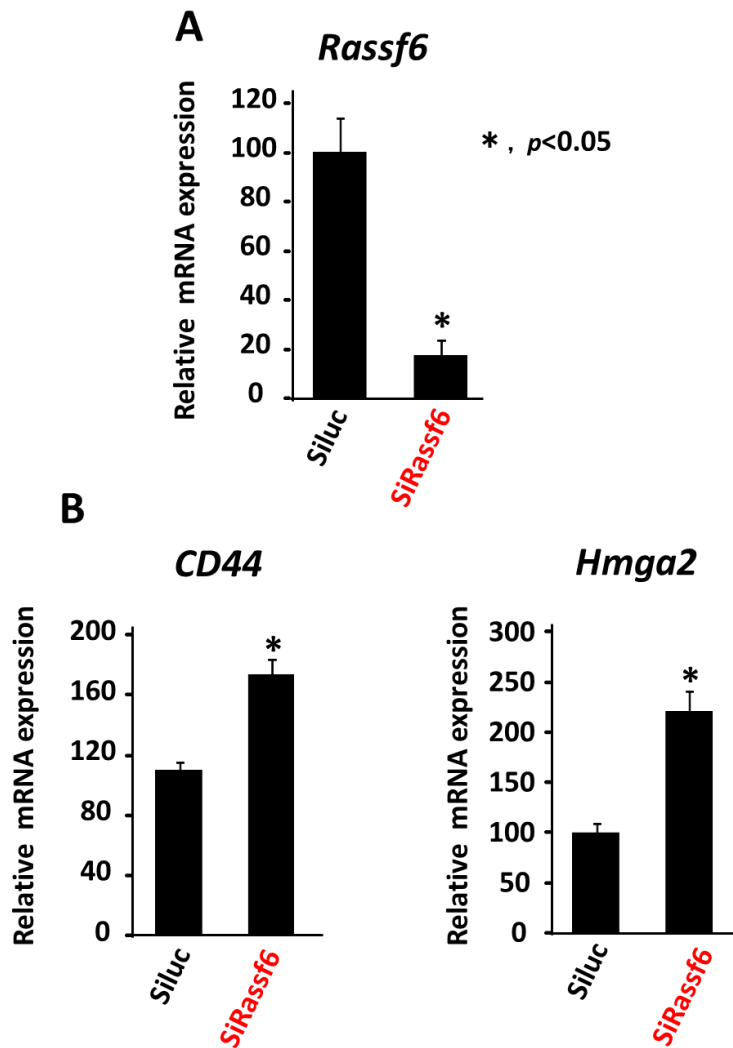


Fig.16 *Rassf6* siRNA を導入した 3T3-L1 細胞の遺伝子発現解析

脂肪細胞における *Rassf6* の生理機能を解析するために、成熟した 3T3-L1 細胞に reverse transfection 法によって *Rassf6* siRNA (si-rassf6 群) を導入し、*Rassf6* のノックダウンを行った。コントロール群としては *luciferase* siRNA (si-luc 群) を導入し、*Rassf6* siRNA の導入による 3T3-L1 細胞における *Rassf6* の発現は、1/8 にまで低下することを real-time PCR 解析を用いて確認した (A)。さらに DNA microarray 法を用いて *Rassf6* のノックダウンによる 3T3-L1 細胞の遺伝子発現変動を解析した結果、si-luc 群と比較して *Rassf6* のノックダウンによって *CD44* と *high mobility group A2* (*Hmga2*) 遺伝子の発現量が増加することを見出し、各 cDNA を用いた real-time PCR 解析によって両遺伝子の発現量は有意に増加することを示した (B)。

## 第4章 脂肪組織の慢性炎症像を非侵襲的に観察する新規モデルマウスの作出

### 4-1. 序論

メタボリックシンドロームは、白色脂肪組織の慢性炎症を引き金としてインスリン抵抗性や高血圧、高脂血症などの疾患群を続発し、心血管疾患などの重篤な疾病のリスクを上昇させることから大きな社会問題として認識されている。メタボリックシンドロームの予防には、白色脂肪組織の慢性炎症の抑制を目指した方策が望まれているが、白色脂肪組織の慢性炎症の発症における詳細な分子メカニズムは不明であり、未だ有効な治療法は開発されていない。一方で、食環境における慢性炎症の抑制が可能となれば、メタボリックシンドロームの有望な予防策にもつながると想定され、脂肪組織の慢性炎症の抑制を目指した機能性食品などの開発が望まれている。特に、脂肪組織に浸潤するマクロファージが脂肪組織の慢性炎症や全身の代謝異常に関わることが明らかにされて以来、脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用が、脂肪組織の慢性炎症の発症における基盤病態であると捉えられ、脂肪組織の慢性炎症の評価においては、脂肪組織に浸潤するマクロファージ数の観察、および脂肪細胞との相互作用の評価が必須となっている。

炎症性疾患を含む様々な疾病に対する食品成分などの機能性を評価する試験では、動物実験が広く行われているが、それらの評価法は、実験終了時に実験動物を屠殺して行う、エンドポイントによる生化学的な解析が主流となっている。従来からの動物評価試験では、病態の発症、進行時における生体内での変化や機能性食品などの機能性の評価について屠殺時点での極めて限定的な情報しか得られない。それらの問題点の解決策としては、複数のエンドポイントを設定し、必然的に  $n$  数を増やした動物実験を計画することが一般的であるが、数多くの実験動物が必要となるなど、用いられる実験動物数、また術式など動物実験での実施内容も動物愛護の観点から重大な社会問題となっている。一方で、近年開発された *in vivo* イメージング技術は、生体内の微弱な化学発光や蛍光を体外から非侵襲的に観察可能な新しい動物実験の評価手法であり [56,57]、生きた個体の組織や細胞がリアルタイムにまた、継時的な観察が可能となった。固定した組織標本、または組織抽出液や遺伝子発現解析などの従来の生化学的な解析では、生きた状態での動態や分子の動きを観察することは不可能であった。一方、*in vivo* イメージング技術では、生体環境における細胞や分子の動きが解析可能であることから、近年では、*Luciferase* 遺伝子などを利用したレポーターマウスが作製され、癌細胞の転移研究や炎症性疾患、さらにはウイルス感染などの種々の疾患モデルへの応用がなされている [59,62,124]。*in vivo* イメージング技術を利用した癌細胞の転移試験では、癌細胞の原発巣から転移巣への浸潤に関して、生きた状態において継時的な観察が可能となり、空間的な情報など、従来からの生化学解析のみでは知りえなかった新たな知見がもたらされ、癌研究の発展に大きく貢献している。一方で、肥満の脂肪組織の慢性炎症を評価す

るモデルとしては、多数の炎症性サイトカインの転写を調節することで、炎症性疾患に関与することが知られている炎症性の転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の制御下において *luciferase* 遺伝子が発現するトランスジェニックマウス (NF- $\kappa$ B-luc mouse) が作出され、炎症像の可視化が試みられた[124,125]。NF- $\kappa$ B は、肥満脂肪組織で産生されることが報告されている TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  によって活性化され、標的遺伝子である炎症性サイトカインの発現量を増加させる。さらに最近の報告では、肥満脂肪組織の NF- $\kappa$ B の活性化は、インスリン抵抗性の発症において重要な役割を担うことが示されるなど、肥満の病態発症において NF- $\kappa$ B の活性化を観察することは重要であると考えられた。実際に、Calsen らは、NF- $\kappa$ B-luc mouse に高脂肪食を与え、肥満を誘導した際の生体内の NF- $\kappa$ B の活性化について非侵襲的な観察を行ったところ、高脂肪食を与えたマウスにおいて正常食群と比較して全身において NF- $\kappa$ B の活性化に基づく化学発光が観察され、特に、高脂肪食摂取マウスにおいて、胸部の領域において高い化学発光が観察された[125]。一方、その化学発光は脂肪組織においては、微弱なものであったことから、NF- $\kappa$ B-luc mouse は、脂肪組織の慢性炎症を特異的に観察することよりもむしろ、全身での NF- $\kappa$ B 活性化の生理機能を探索する有用なモデルマウスであると考えられた。そのため、脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に観察する手法は未だ開発されておらず、本研究では肥満脂肪組織の慢性炎症を評価する動物モデルの作出を目指した。

肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加、および同細胞の活性化は、インスリン抵抗性などの二次的な合併症と深く関連することがマクロファージの浸潤を抑制させたモデルマウスの形質の解析やヒトにおける臨床試験からも明らかにされており、*in vivo* イメージング技術を利用して肥満脂肪組織の慢性炎症を評価するには、脂肪組織に浸潤するマクロファージ数の観察を可能としないといけない。肥満脂肪組織の慢性炎症の可視化を目指すにあたり、マクロファージ自身をイメージング解析によって観察することは、評価における組織特異性を鑑みた場合、全身におけるマクロファージの存在は不利であると考えた。また、肥満脂肪組織の体積の大半を占める脂肪細胞の存在も、化学発光の強度を鑑みた場合にマクロファージ自身を可視化する方策が得策ではないと結論付けた。一方で、本研究では既に、脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用が脂肪細胞に及ぼす影響を *in vivo* において解析しており、実際に、脂肪組織に浸潤するマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現量が変化する脂肪細胞由来の遺伝子を複数単離している。本章では、マクロファージの脂肪組織への浸潤に関連して脂肪細胞において発現量が増加する因子群の中で、特に、白色脂肪組織の炎症状態を鋭敏に反映する脂肪細胞由来の因子の選抜を行い、同因子の promoter 活性を利用して、マクロファージの浸潤に関連する脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価する新規動物モデルの構築を目指した。*in vivo* および *in vitro* におけるマクロファージと脂肪細胞との相互作用の解析を通して、肥満脂肪組織特異的に発現増加し、かつ脂肪組織のマクロファージの浸潤量を鋭敏に反映する候補遺伝子として *serum amyloid A3 (Saa3)* 遺伝子

を見出した。さらに *Saa3* 遺伝子の promoter 領域 (-314/+50) の下流に *luciferase* 遺伝子を連結した *Saa3-luciferase (saa3-luc)* キメラ遺伝子を構築し、マクロファージの浸潤を *Saa3* 遺伝子の promoter 活性に基づく化学発光を指標として評価することを着想した。マイクロインジェクション法によって *Saa3-luc* キメラ遺伝子を受精卵へ導入し、トランスジェニックマウスを作製した (*Saa3-luc mouse*)。作出した *Saa3-luc mouse* に高脂肪食を負荷して肥満を誘導し、*in vivo* イメージング解析を行うことで、肥満白色脂肪組織の慢性炎症の非侵襲的な評価を行った。

## 4-2. 研究材料、および実験手法

本研究で行う遺伝子組換え実験、および動物実験については、広島大学における教育訓練を受け、従事者として登録を行ったうえで実施している。また、本研究の動物実験は、広島大学動物実験委員会において実験の手順、および方法について承諾を得ており、また遺伝子組み換え実験においては、関連する法令等を遵守しながら遂行した。動物実験に関しては、広島大学承認番号 C11-23 において承認済みであり、遺伝子組換え生物使用実験に関しては広島大学承認番号 23-141 において承認済みである。

### 4-2-1. 一般試薬

一般試薬は、主に nacalai tesque、Sigma の特級試薬を用いて行った。制限酵素は、タカラバイオ社製または東洋紡社製のものを使用した。

### 4-2-2. 菌株およびベクター

#### 菌株

形質転換に用いた大腸菌株は、*Escherichia coli* Hit-DH5α(RBC Bioscience 社製)を使用した。

#### plasmid vector

pBluescript SK+は、STRATAGENE 社から購入した。pMX-puro は、亀井康富博士（東京医科歯科大、現京都府立大）より御供与いただいた。pRRL-Sin cPPT は、Fons van De loo 博士（Radbond University Nijmegen Medical Center, Netherlands）より御供与いただいた。

### 4-2-3. agarose gel 電気泳動

#### 1% agarose gel の作製

1% agarose

1×TBE

上記の試薬の調製はミリ Q 水で行った。

#### DNA 精製用 agarose gel の作製

1% SeaKem GTG Agarose (CAMBREX 社製)

1×TAE (nacalai tesque 社製)

上記の試薬の調製はミリ Q 水で行った。

#### agarose gel 電気泳動

DNA 溶液に対し、6×Loading Dye (TOYOBO 社製) を混合し、agarose 電気泳動用の試料とした。agarose gel の各ウェルに試料をアプライし、1×TBE バッファー中で 100V の定電流で電気泳動を行った。泳動時間は、サンプルの DNA の大きさによってその都度、最適な泳動時間を決定した。

#### 4-2-4. 大腸菌培養用の培地調製、および plasmid 抽出液の調製

##### LB 寒天培地 (LB プレート) の調製

1% tripton

0.5% yeast extract

0.5% NaCl

1.5% agar

上記の組成となるように蒸留水で調製してオートクレーブを行い、ampicillin (終濃度 200 µg/ml) または kanamycin (終濃度 40 µg/ml) を添加した後、90 mm×15 mm の滅菌シャーレに培地を流し込み、クリーンベンチ内で室温まで冷まして固めたものを使用した。

##### LB 液体培地の調製

1% Tripton

0.5% Yeast extracts

0.5% NaCl

蒸留水で調製してオートクレーブを行い室温で保存し、使用直前に ampicillin (終濃度 200 µg/ml) または kanamycin (終濃度 40 µg/ml) を添加して使用した。

##### plasmid 抽出試薬の調製

###### **Solution I**

50 mM glucose

25 mM Tris-HCl (pH8.0)

10 mM EDTA

###### **Solution II**

0.2 N NaOH

1% SDS

###### **Solution III**

3 M potassium acetate

5 M acetic acid

上記の組成となるように dH<sub>2</sub>O で調製して、Solution II は 4℃で、それ以外は室温で保存した。Solution II は、使用する前に 37℃の恒温槽で 15 分温め、塩が完全に溶解

していることを確認して使用した。

#### 4-2-5. Luciferase assay 用の溶液調製

##### Lysis buffer の作製

25 mM Tris-HCl (pH7.5)

10% glycerol

1% Triton-X 100

2 mM dithiothreitol (DTT) (使用直前に添加した)

上記の組成となるようにオートクレーブしたミリ Q 水に調製した。

#### 4-2-6. DNA microarray 解析

##### 共存培養法による 3T3-L1 細胞の遺伝子の発現解析

Nishimura らのグループによって、transwell system を用いた 3T3-L1 細胞と RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) との共存培養が行われ、*in vitro* 培養系においてマクロファージとの相互作用による 3T3-L1 細胞の遺伝子発現変動を Gene chip (Affymetrix 社製) を用いた網羅的、かつ継時的な解析が行われた[126]。本章では、24 時間共存培養した際の 3T3-L1 細胞において 5 倍以上発現が上昇した因子群を選抜し、その実験結果を比較解析に供した。

##### dbldb マウスの精巣周囲白色脂肪組織において高発現する遺伝子の発現解析

1-2-5. DNA microarray 解析の項において、*dbldb* マウスおよび *dbl+* マウスの精巣周囲白色脂肪組織における遺伝子発現変動を網羅的に解析しており、本章では、*dbldb* マウスの脂肪組織において 5 倍以上発現が高い因子群を選抜し、比較解析に供した。

#### 4-2-7. mouse *Saa3* 遺伝子の promoter 領域クローニング

*Saa3* 遺伝子の promoter 領域 (-314/+50) を含む pRRL-Sin cPPT lentivirus vector を Fons van de loo 博士 (Radboud University Nijmegen Medical Center, Netherlands) より供与していただき、以下の実験に用いた。*Saa3* promoter (-314/+50) 領域を pGL3.0 (Promega) に連結させ、pGL-Saa3p とし、塩基配列の決定により変異の無いことを確認した。次に pGL-Saa3p より、-314/+50 の *Saa3* promoter 遺伝子と *Luciferase* 遺伝子を含む DNA 断片の調製を行った。pMX-puro への組み換えを行うために、*EcoRI*、*NotI* サイトをそれぞれ有する以下の primer を設計し、PCR 反応に供した。

sense primer                                    5'-CCGAATTCGTCGACTTGGATTGGATCCC-3'

antisense primer                                5'-GGGCGGCCGCTCTAGAATTACACGGCGATC-3'

上記のように sense 鎖に *EcoRI* を付加し、antisense 鎖に *NotI* を付加した。

PrimeSTAR DNA polymerase (Takara Bio 社製) を用いて PCR 反応を行った。以下

に反応組成を記した。

PrimeSTAR DNA polymerase	0.25 $\mu$ l
5x PrimeSTAR DNA polymerase buffer	10 $\mu$ l
dNTP Mix	4 $\mu$ l
pGL-Saa3p	1 $\mu$ l
sense primer	0.5 $\mu$ l
antisense primer	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	33.7 $\mu$ l

上記の反応溶液を混合し、サーマルサイクラー (Perkin Elmer 社製) を用いて PCR 反応を行った。95°C で 2 分間熱処理し、95°C 15 秒間→65°C 10 秒間→72°C 1 分 30 秒間の条件下で計 30 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。PCR 反応終了後、50  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を加え、全量を 100  $\mu$ l とした。High pure PCR purification Kit (Roche 社製) を用いて、PCR 産物の精製を行った。以下にその手順を記す。100  $\mu$ l の反応溶液に 500  $\mu$ l の結合 buffer 1 を加えて転倒混合を行った。カラムチューブに全量を移し、卓上遠心機で遠心 (8,000 g、1 分間) した後、フロースルー画分をデカントにて除去した。Wash buffer 500  $\mu$ l をカラムに添加し、さらに遠心 (8,000 g、1 分間) した。Wash buffer 200  $\mu$ l で再度洗浄を行った後に、遠心 (8,000 g、1 分間) を行い、カラムを滅菌した 1.5 ml 容チューブに入れ、Elution buffer 350  $\mu$ l で溶出を行った。agarose gel 電気泳動を行い、PCR 産物の確認を行い、Saa3-luciferase キメラ DNA (*EcoRI-NotI* サイトを有する) 溶液とした。

#### 4-2-8. Saa3-luc 組み換え plasmid の作製

##### pBluescript SK+/Saa3-luc の作製

4-2-7.の項において精製を行った Saa3-luciferase キメラ DNA を、pBluescript SK+ に連結させた組換え plasmid を作製し、以後の組換え実験に供した。すなわち、*EcoRV* 処理を行った pBluescript SK+ T 1.0  $\mu$ l と Saa3-luciferase キメラ DNA 溶液 3.0  $\mu$ l を ligation 1 溶液 (DNA Ligation Kit ver.2、Takara Bio 社製) 4  $\mu$ l と混合し、16°C で 3 時間インキュベートして ligation 反応を行った。この ligation 反応液 3.0  $\mu$ l を 25.0  $\mu$ l の *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (以下 DH5 $\alpha$ ) に混合し、混合した後に、氷上で 15 分静置した。heat shock を行った後、あらかじめ 37°C で保温しておいた LB 培地 200  $\mu$ l を加えて穏やかに混合し 37°C で 15 分間インキュベートした。この大腸菌溶液を 0.1 M IPTG、40 mg/ml X-gal を 40  $\mu$ l ずつ塗布した LB プレート (200  $\mu$ g/ml ampicillin) に播種し、37°C で 16 時間培養した。培養後のプレートから白いコロニーのみを滅菌した爪楊枝で単離し、液体 LB 培地 3.0 ml (200  $\mu$ g/ml ampicillin) につけ、37°C で 16 時間、振とう培養した。コロニー単離と同時に、新しい LB プレート (200  $\mu$ g/ml ampicillin) に爪楊枝でストリークしマスタープレートを作製した。アルカリ SDS 法を用いてプラ



スミドを抽出した後に、*EcoRI*、および *NotI* で DNA 断片の挿入を確認した。目的のプラスミドを含む大腸菌をマスタープレートから滅菌した爪楊枝で単離し、40 ml の LB 培地 (200 µg/ml ampicillin) につけ、37°C で 16 時間振とう培養した。大量の大腸菌溶液を 50 ml 容チューブに移し、遠心 (12,000 g、4°C、10 分間) によって菌体を回収した後、Geno pure Plasmid Midi kit (Roche 社製) を用いて plasmid を精製した。nano drop 2000 を使って DNA 濃度を測定し、以後の実験まで 4°C で保存した。

### **pMx-puro/Saa3-luc の作製**

pBluescript SK+ T-vector と融合させた Saa3-luc plasmid を制限酵素 *EcoRI*、および *NotI* を用いて切断した。亀井博士より御供与いただいた retrovirus vector である pMx-puro を同様に *EcoRI*、および *NotI* を用いて切断した。各制限酵素溶液 50 µl を Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) で解析を行い、UV 照射下で gel から DNA 断片を切り出し、エレクトロエリ्यूションにより DNA 断片を回収した。エレクトロエリ्यूションの条件を以下に記す。切り出した断片を 1×TBE で満たした透析チューブ内に入れ、1×TBE の泳動バッファーを用い、150 V の定電圧で 30 分間通電し、gel から DNA 断片の回収を行った。DNA 抽出液を 1.5 ml チューブに分注し、等量の phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) を加え、15 秒間 voltex によって激しく攪拌し室温で 3 分間静置した後、遠心 (12,000 g、15°C、5 分間) した。上層画分を新しい 1.5 ml 容チューブに移し、EtOH 沈殿を行い、-80 °C で静置した。EtOH 沈殿させた DNA サンプルを遠心 (12,000 g、4 °C、15 分間) し、70% EtOH で洗浄し、減圧乾燥させた。滅菌水を 7 µl ずつ添加し、それぞれの DNA 溶液とした。酵素切断を行った DNA 溶液を、ligation 1 溶液 (DNA Ligation Kit ver.2、Takara Bio 社製) を用いて pMX-puro と Saa3-luciferase 遺伝子とを連結させた plasmid を作製し、pMX-puro/Saa3-luc とした。*EcoRI* および *NotI* を用いて制限酵素処理を行い、切断された断片を agarose gel 電気泳動によって分離し、組換えの確認を行った。

### **4-2-9. Saa3-luciferase 遺伝子の安定形質転換 3T3-L1 細胞の樹立**

#### **Saa3-luciferase 遺伝子を含むウイルス粒子の産生**

パッケージング細胞である phoenix293 細胞を  $4.0 \times 10^5$  cells/35 mm dish の条件で播種し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> で培養した。翌日、Gene juice transfection reagent (Novagen 社製) を用いて、pMX-puro/Saa3-luc plasmid、および pMX-puro plasmid を phoenix293 細胞へ形質導入した。形質導入は、Novagen 社推奨の transfection プロトコールに準じて行った。37°C、5 % CO<sub>2</sub> で 8 時間培養した後、さらに 32°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 48 時間培養し、ウイルス粒子を培養上清中に産生させた。次いで、このウイルス粒子を含む培養上清 2.5 ml を 15 容チューブに移し、5 mg/ml 臭化ヘキサジメトリンを 2.5 µl (終濃度 5 µg/ml) 添加し、混合した後、ウイルス溶液とし、-80°C で保存した。

### **3T3-L1 細胞へのレトロウイルスの感染、および安定形質転換 3T3-L1 細胞の樹立**

細胞培養用の DMEM 培地を用いて、3T3-L1 細胞を 35 mm dish (CORNING 社製) に  $2 \times 10^4$  cells の条件で播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  で培養した。翌日、 $-80^\circ\text{C}$  で保存しておいたウイルス溶液 1 ml を  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルター (Millipore 社製) でフィルトレートし、DMEM 培地 1 ml と混合した後、3T3-L1 細胞の培地の交換を行った。 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  で 24 時間培養した後、ウイルス粒子を含まない DMEM 培地に交換した。さらに 24 時間培養した後に、 $10 \mu\text{g/ml}$  puromycin を含む DMEM-puro<sup>hi</sup> 培地と交換し、3~4 日培養した後、puromycin 耐性の 3T3-L1 細胞 (3T3-L1/Saa3-luc) のみを単離した。以降の 3T3-L1/Saa3-luc 細胞の培養、および継代は  $2 \mu\text{g/ml}$  puromycin を含む DMEM-puro<sup>low</sup> 培地を用いて、**1-2-8. 3T3-L1 細胞の培養、および継代**の項に記載した方法に準じて行った。安定形質転換 3T3-L1/Saa3-luc 細胞における luciferase の発現は、後に記載する luciferase assay 法を用いて確認した。

#### **4-2-10. Saa3-luc mouse の樹立**

##### **transgene 用 Saa3-luciferase 遺伝子の精製**

4-2-7.の項で作製した pGL-Saa3p ベクター  $10 \mu\text{g}$  を *Pvu* I で制限酵素処理を行い、転写終結 poly A サイトを含んだ 4.1 kbp の領域の DNA を切り出し、DNA 精製用の agarose gel で電気泳動を行った。目的の DNA を agarose gel より切り出し、Qiagen gel extraction kit (Qiagen 社製) を用いて、DNA の精製を行った。以下に、精製手順を記す。切り出したゲルの重量を電子天秤により正確に測定し、 $0.398 \text{ g}$  のゲルに対して  $1.2 \text{ ml}$  の Buffer QG を添加した。ヒートブロックを用いて、 $50^\circ\text{C}$  で 10 分間加温してゲルを完全に溶解させた。Qiaquick colum に溶解させた溶液全量を移し、1 分間遠心 ( $12,000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) を行い、フロースルー画分を除去した。さらに、Buffer QG を  $500 \mu\text{l}$  加え、カラム上のゲルを溶解させ、1 分間遠心 ( $12,000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。洗浄のため、Buffer PE を  $750 \mu\text{l}$  添加し、2 分間静置させた後、1 分間遠心 ( $12,000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。フロースルー画分を除去し、さらに 1 分間 ( $12,000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) 遠心を行い、カラムを乾燥させた。 $1.5$  容チューブにカラムを移し、 $30 \mu\text{l}$  の  $\text{dH}_2\text{O}$  で溶出させ、nano drop 2000 を使って DNA 濃度を測定した。

##### **transgenic mouse の作製**

精製した DNA 断片を *Bgl* II で制限酵素処理し、目的断片であることを確認した。精製した Saa3-luciferase を含む transgene 溶液 ( $4.1 \text{ kbp}$ 、 $51.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) を日本エスエル

挿入および、偽妊娠マウスへの受精卵の移植を委託し、89 匹の仔マウス (F0) を得た。

### transgenic mouse のゲノム DNA の抽出

得られた F0 マウスの尾の先端を切断し、1.5 ml チューブに移し、300  $\mu$ l の DNA 抽出溶液を添加した後、55°C で一晩インキュベートした。翌日、DNA 抽出液に等量の phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, pH7.9) (nacalai tesque 社製) を加え、室温で 30 分間転倒混和した後、室温で遠心 (12,000 g, 10 分間) を行い、上層の水層画分を新しい 1.5 ml チューブに移した。回収した溶液に RNase 溶液を 5  $\mu$ l 加え、室温で 30 分間インキュベートした後、等量の phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, pH7.9) を加え、30 分間転倒混和した。その後、室温で遠心 (12,000 g, 10 分間) を行い、上層の水層画分を新しい 1.5 ml チューブに移し、1 ml の 100% EtOH を加え、転倒混和した後、-80°C で 15 分間静置した。その後、4°C、12,000 g、15 分間遠心を行い、上清を除去した。生じたペレットに 70% EtOH を 1 ml 加え、4°C、12,000 g、5 分間遠心しペレットの洗浄を行い、上清を完全に除去した後、減圧乾燥を行った。ペレットに 500  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を加え、一晩 4°C で溶解させ、ゲノム DNA 溶液とした。

### PCR 増幅による transgene の検出

マウスの尾から抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR 増幅によって染色体に組み込まれた transgene の検出を行った。プライマーは、*Saa3* 遺伝子の promoter 領域と *luciferase* 遺伝子の領域を挟み込むようにし、内在性の染色体 DNA に反応しない領域を設計した。用いたプライマーは、下記に記した。

sense primer            5'-CCGAATTTCGTCGACTTGGATTGGATCCC-3'

antisense primer      5'-GGGCGGCCGCTCTAGAATTACACGGCGATC-3'

PCR の反応組成および条件は、以下に記した。

#### Go-Taq Green master mix (20 $\mu$ l scale)

Green master mix	7.5 $\mu$ l
nuclease free water	6.1 $\mu$ l
ゲノム DNA	1.0 $\mu$ l
sense primer	0.2 $\mu$ l
antisense primer	0.2 $\mu$ l

上記組成の PCR 溶液を丁寧に混合し、PCR 用 8 連チューブに加えスピンドウンした後、サーマルサイクラーにセットして PCR 反応を開始した。95°C で 2 分間熱処理し、95°C 40 秒間→58°C 40 秒間→72°C 1 分間の条件下で、計 26 サイクルの PCR 反応を

行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。

### **Saa3-luc F1 mouse の作製**

尾の DNA を用いた transgene 検定によって遺伝子導入が確認された 10-3 系統の雄性マウス (F0) と雌性 C57/BL マウスとを交配させ、F1 マウスを得た。得られた F1 マウスも尾の先端からゲノム DNA を抽出し、同様に transgene の検定を行った。F3 世代まで交配を繰り返し替えし、以後の実験に供した。

### **4-2-11. 3T3-L1/Saa3-luc 細胞を用いた共存培養法、およびサイトカイン刺激**

3T3-L1/Saa3-luc 細胞を transwell 12 well culture plate に  $8 \times 10^4$  cells/well の条件で播種し、1-2-8. の項の定法に従って分化誘導を行った。分化誘導 8 日後(day 8)に 1-2-8. **8. Transwell system を用いた共存培養** の項で記した方法に準じて共存培養に供した。また、同様に 12well culture plate に 3T3-L1/Saa3-luc 細胞を播種し、分化誘導を行った 8 日後(day 8)の 3T3-L1/Saa3-luc 細胞に RAW 細胞の培養上清 (MacCM) および LPS 刺激した RAW 細胞の MacCM を添加し、18 時間刺激を行った。さらには、10 mg/ml の mouse TNF- $\alpha$  を終濃度 10 ng/ml になるように DMEM 培地に添加し、24 時間刺激を行った。

### **4-2-12. 動物飼育**

#### **db/db マウスの飼育**

7 週齢の雄性 db/db マウス、およびコントロールとして雄性 db/+ マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル (8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24 $\pm$ 1°C) で飼育を行った。飼育条件は、2-2-3. **db/db マウスの飼育** の項に記載した。

#### **C57BL/6J マウスの飼育**

5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入した。12 時間明暗サイクル(8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24 $\pm$ 1°C) で飼育を行った。飼育条件は、2-2-3. **C57BL/6J マウスの飼育** の項に記載した。

#### **Saa3-luc mouse の飼育**

本章では、F3 世代まで戻し交配を行ったマウスを実験に供し、12 時間明暗サイクル(8:00~21:00 は明、21:00~8:00 は暗)、恒温 (24 $\pm$ 1°C) で飼育を行った。5 週齢の雄性 Saa3-luc mouse を、通常食 AIN-93G を自由摂食させる ND 群、および高脂肪食を自由摂食させる HFD 群の 2 群に分けた。継時的なイメージング解析を行いつつ、高脂肪食摂取 16 週間後に屠殺し、精巣周囲白色脂肪組織を含む各組織を摘出して生化学的解析に供した。

#### 4-2-13. *db/db* マウスおよび *db/+* マウスの各組織の抽出および RNA 抽出

絶食 5 時間後に精巣周囲の白色脂肪組織 (white adipose)、肝臓 (liver)、腎臓 (kidney)、心臓 (heart)、大腸 (colon)、小腸 (intestine)、骨格筋 (skeletal muscle)、精巣 (testis)、脾臓 (spleen) を抽出した。抽出した各組織重量を測定し、精巣、および脾臓は 15 ml 容チューブに分注した QIAzol reagent (Qiagen 社製) 1 ml に加え、その他の組織は、15 ml 容チューブに分注した QIAzol reagent 2 ml に加え、ホモジナイザーで完全に破碎して 30 分間室温にて静置した後、total RNA の調製まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。total RNA の調製は、RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen 社製) を用いて、**1-2-7. 組織からの total RNA の調製**の項および Qiagen 社推奨のプロトコールに準じて行った。

#### 4-2-14. RT-PCR 解析

##### 逆転写反応による cDNA の合成

各サンプルからの cDNA 合成は、抽出した total RNA を 500 ng から 1  $\mu\text{g}$  までの一定量に調製し、RevaTra Ace RT (TOYOBO 社製) を用いて **1-2-7. cDNA 合成**の項に準じて行った。

##### RT-PCR

合成した cDNA を用いて Go-Taq DNA polymerase (Promega 社製) による PCR 反応を行った。増幅産物 10  $\mu\text{l}$  を 5% PAGE で電気泳動を行った。電気泳動は  $1\times\text{TBE}$  の泳動 buffer を用い、200 V の定電圧で 40 分間の条件で行った。電気泳動終了後、gel を ethidium bromide (EtBr) 溶液に 10 min 間浸し、UV 照射により増幅 DNA のバンドのパターンを確認した。

以下に PCR 反応の手順を記す。

PCR 反応は 1 サンプルあたり以下の反応スケールでサンプルを調製した。

##### Go-Taq Green master mix (20 $\mu\text{l}$ scale)

Green master mix	10.0 $\mu\text{l}$
nuclease free water	8.0 $\mu\text{l}$
cDNA	1.0 $\mu\text{l}$
sense primer	0.5 $\mu\text{l}$
antisense primer	0.5 $\mu\text{l}$

スピンドウンした後、PCR 用 8 連チューブに上記の反応液を加え、サーマルサイクラーにセットした。95 $^{\circ}\text{C}$  で 2 分間熱処理し、95 $^{\circ}\text{C}$  40 秒間→58 $^{\circ}\text{C}$  40 秒間→72 $^{\circ}\text{C}$  1 分間

の条件下で、計 28 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間熱処理し、反応を停止させた。

本研究で使用した合成 primer は全て 100 μM で使用した。下記に使用した合成 primer を記す。

mouse *Tnf-α*

sense primer 5'-CCGATGGGTTGTACCTTGTC-3'

antisense primer 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'

mouse *Mpeg1*

sense primer 5'-GCTTGCCCTCTGCATTTCTTC-3'

antisense primer 5'-TCTTCTGCTCCAGGTTTTGG-3'

mouse *Emr1*

sense primer 5'-ATTGTGGAAGCATCCGAGAC-3'

antisense primer 5'-GTAGGAATCCCGCAATGATG-3'

mouse *Saa3*

sense primer 5'-TTGATCCTGGGAGTTGACAG-3',

antisense primer 5'-CACTCATTGGCAAACCTGGTC-3'

*β-actin (mouse, human)*

sense primer 5'-TTGGGTATGGAATCCTGTGGCATC-3'

antisense primer 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'

mouse *L-19*

sense primer 5'-GGCATAGGGAAGAGGAAGG-3'

antisense primer 5'-GGATGTGCTCCATGAGGATGC-3'

**real-time PCR による発現解析**

real-time PCR 反応には、THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社製) を使用した。primer と鋳型 cDNA は上記の項と同様のものを使用し、反応組成、および反応条件は **1-2-7. real-time PCR による発現解析** の項に記載した方法に準じて行った。

**4-2-15. Luciferase activity の測定**

### **3T3-L1/Saa3-luc 細胞における luciferase activity の測定**

4-2-11. 3T3-L1/Saa3-luc 細胞を用いた共存培養法、およびサイトカイン刺激の項において、各刺激を行った際の 3T3-L1/Saa3-luc 細胞における *Saa3* 遺伝子の promoter 活性に基づく luciferase activity の測定を行った。刺激後の 3T3-L1/Saa3-luc 細胞の培養上清を取り除き、PBS(-)を 1 ml 加えて洗浄を行った後 PBS(-)を除去した。各ウェルに 400  $\mu$ l の Lysis buffer を加えて細胞を溶解し、1.5 容チューブに全量を回収した。ソニケーション処理を 15 秒間行い、細胞を完全に破砕した後、10 分間遠心 (12,000 g、4 $^{\circ}$ C) を行い、上清 150  $\mu$ l を回収し luciferase activity の測定用のサンプルとした。ピッカジーン試薬 (TOYO ink 社製) をあらかじめ 37 $^{\circ}$ C で 15 分間保温し、サンプル 10  $\mu$ l に対してピッカジーン試薬 50  $\mu$ l を混合して luminometer (Turner Model TD-20) を用いて luciferase activity を測定した。測定後、Lowely 法を用いて各サンプルのタンパク濃度を定量し、測定した luciferase activity の値は総タンパク濃度で補正を行った。

### **Saa3-luc mouse の各組織における luciferase activity の測定**

絶食 5 時間後に Saa3-luc mouse より、精巣周囲の白色脂肪組織、肝臓、腎臓、大腸、小腸の各組織を摘出した。摘出した組織重量を測定し、Lyssis buffer 700  $\mu$ l を加え、ホモジナイザーで完全に破砕した後、10 分間遠心 (12,000 g、4 $^{\circ}$ C) を行った。遠心後、上清 200  $\mu$ l を回収し、luciferase activity 測定用の組織サンプルとした。サンプル 10  $\mu$ l に対して、細胞からの luciferase activity 測定と同様に、50  $\mu$ l のピッカジーン試薬を加え、luminometer で luciferase activity を測定した後、総タンパク質濃度を測定して luciferase activity の補正を行った。

### 4-3. 実験結果

#### 4-3-1. 単球・マクロファージの浸潤量のモニターに利用される脂肪細胞に由来する因子の単離

Nishimura らのグループによって、transwell system を用いた 3T3-L1 細胞と RAW 細胞との共存培養が行われ、*in vitro* 培養系において、マクロファージとの相互作用によって影響を受ける 3T3-L1 細胞の遺伝子発現変動の網羅的な解析が Gene chip (Affymetrix 社製) を用いて行われた[126]。本研究では、その実験結果を供与いただき、RAW 細胞、および LPS 存在下で活性化させた RAW 細胞と共存培養を行った成熟 3T3-L1 細胞の 2 群間での遺伝子発現変動の解析結果と、DNA microarray 法を用いて第 1 章において行った遺伝性肥満病態モデル (*db/db*) マウス、およびコントロール (*db/+*) マウスの精巣周囲白色脂肪組織における 2 群間の遺伝子発現変動の網羅的な解析結果とを比較解析に供した。まず、肥満脂肪組織において、5 倍以上発現が誘導される因子群 402 遺伝子を単離した。さらには、共存培養によって活性化したマクロファージに応答して脂肪細胞で 5 倍以上発現が上昇した 224 遺伝子群を単離し、両遺伝子群の重ね合わせ解析によって、活性化マクロファージの脂肪組織への浸潤に鋭敏に応答する候補の脂肪細胞因子群として 15 遺伝子を単離した (Fig 17)。候補遺伝子の promoter 活性を化学発光法によって可視化する際に、promoter 活性の組織特異性、すなわち、候補遺伝子の発現変動が肥満時の白色脂肪組織特異的であることが望ましいことから、さらなる候補遺伝子の絞り込みを行った。*db/db* マウス、および *db/+* マウスの肝臓、小腸、腎臓、骨格筋、脾臓、精巣、および精巣周囲脂肪組織を摘出し、それぞれの total RNA を抽出した後、逆転写反応によって cDNA を作製した。さらに、各組織の cDNA を用いて、real-time PCR 法による候補遺伝子の各組織における遺伝子発現解析を行った結果、*db/db* マウスの白色脂肪組織特異的に mRNA の高発現が認められた遺伝子は、*tissue inhibitor metalloproteinase 1 (Timp1)*, *interleukin 1 receptor antagonist (Il-1rn)*, *serum amyloid A3 (Saa3)* の 3 遺伝子であった (Fig.18)。これら 3 遺伝子の中で、マクロファージとの共存培養によって脂肪細胞において発現の上昇率がもっとも高かった *Saa3* 遺伝子を見出し、肥満時のマクロファージの浸潤量の増加に関連して白色脂肪組織において発現上昇する脂肪細胞由来の遺伝子であり、非侵襲モデルマウスに用いる有力な候補遺伝子であると考えた。

#### 4-3-2. マクロファージとの相互作用に応答する *Saa3* 遺伝子の発現解析

候補遺伝子として先に単離した *Saa3* 遺伝子の発現解析を個体別において試みた。*db/db* および *db/+* マウス (各群 n=3) の各個体の脂肪組織由来の total RNA を調製して逆転写反応に供し、cDNA を調製した。*Saa3* 遺伝子の特異的 primer を設計し、real-time PCR 法を用いて、精巣周囲白色脂肪組織における *Saa3* 遺伝子の発現解析を行った結果、*db/db* マウスの白色脂肪組織において *Saa3* 遺伝子の発現量が 7.8 倍に有意に高まることを明らかにした (Fig.19A)。さらに、real-time PCR 法を用いた発現解析の結果、食餌誘導性肥満マウス



の脂肪組織においても *Saa3* 遺伝子の発現量は 8.2 倍にまで有意に高発現していることを見出した (**Fig.19B**)。マクロファージの浸潤量の指標としてマクロファージのマーカー遺伝子である *Emr1*、*Mpeg1* 遺伝子の発現解析を行い、*db/db* マウスおよび食餌誘導性肥満マウスの白色脂肪組織において両遺伝子とも有意に高発現していた (**Fig.19A、B**)。さらに、transwell system を用いて RAW 細胞と 3T3-L1 細胞との共存培養を行い、*in vitro* での両細胞の相互作用によって脂肪細胞において *Saa3* 遺伝子の発現量が変動するかを解析した。RAW 細胞と共存培養させた際の 3T3-L1 細胞由来の cDNA を調製し、RT-PCR 法による *Saa3* 遺伝子の発現解析を行った結果、LPS 刺激のみでは脂肪細胞における *Saa3* 遺伝子の発現は誘導されない一方で、活性化マクロファージと共存培養した 3T3-L1 細胞において *Saa3* 遺伝子の発現は著しく増加した (**Fig.20A**)。さらに分化成熟した 3T3-L1 細胞にマクロファージの培養上清、または LPS 刺激を行ったマクロファージの培養上清による刺激を行った結果、活性化マクロファージの培養上清で刺激した 3T3-L1 細胞で *Saa3* 遺伝子の発現は有意に増加した。また、マクロファージの代表的なメディエーターである TNF- $\alpha$  刺激によっても *Saa3* 遺伝子の発現は有意に増加した (**Fig.20B**)。DNA microarray 解析によって、vitamin B6 (B6) を高含量で摂取させたマウスの脂肪組織において *Saa3* 遺伝子の発現が抑制されていることを見出した。前章までに、B6 を高含量で摂取させたマウスの脂肪組織では、マクロファージの浸潤が選択的に抑制されており、肥満脂肪組織におけるマクロファージの浸潤に関連した病態的变化を解析するツールとして有効であることを示し、実際に、マクロファージの浸潤に関連して脂肪細胞において発現量が増加する *Ikke*、*Ptx3*、*Mmp3* 遺伝子は、高 B6 摂取によってその発現が低下する。real-time PCR 法によって、個体別に *Saa3* 遺伝子の発現解析を実施した結果、B6 摂取量の増加によって *Saa3* 遺伝子の発現量は減少する傾向が示された (**Fig.21A**)。さらには *Saa3* 遺伝子の脂肪組織での発現量を real-time PCR 法を用いて定量化し、一方で、F4/80 抗体を用いた組織免疫染色による同組織のマクロファージの浸潤数を数値化することで、両者の相関の有無を検討した結果、*Saa3* の mRNA 発現量とマクロファージ浸潤量とは正に相関することを示した (**Fig.21B**)。また、*Saa3* 遺伝子の発現量と *Tnf- $\alpha$*  との発現量にも正の相関が認められたことから、脂肪組織へ浸潤するマクロファージが産生する TNF- $\alpha$  によって部分的に *Saa3* 遺伝子の発現が誘導されていることが示唆された (**Fig.21C**)。酵素分散法によって分画を行った成熟脂肪細胞画分 (adipocyte) において *Saa3* mRNA の発現は確認され、その発現は肥満の進行に伴って高発現していることが認められた (**Fig.21D**)。以上の結果より、*Saa3* 遺伝子は、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の増加に応答して脂肪細胞で発現が誘導されることが示唆された。

#### **4-3-3. *Saa3* 遺伝子の promoter 領域の単離、および promoter 活性の解析**

*Saa3* 遺伝子は、Geurts らによって、関節リウマチの発症過程において滑膜細胞で有意に発現増加する遺伝子として同定され、その promoter 領域 (-314/+50) は、関節リウマチの発症において滑膜細胞において高い転写活性を示し、炎症の発症過程に関与する promoter

領域であることが示唆されている[127]。本研究では、*Saa3* 遺伝子の promoter 領域(-314/+50)の下流に *luciferase* 遺伝子を連結したコンストラクト(*Saa3-luc*)を作製し(Fig.22A)、pMx-puro への組換えを行い、レトロウイルス法により 3T3-L1 細胞へ形質導入を行った。*Saa3-luc* 安定形質転換 3T3-L1 細胞(3T3-L1/*Saa3-luc* 細胞)を樹立し、*luciferase* 活性を測定した。RAW 細胞との共存培養系における *luciferase* 活性を測定した結果、活性化した RAW 細胞と共存培養した 3T3-L1/*Saa3-luc* 細胞において *luciferase* 活性は 7.8 倍にまで上昇した。さらには、活性化したマクロファージの培養上清による刺激によって *luciferase* 活性は 12 倍上昇し、炎症性メディエーターである TNF- $\alpha$  刺激によっても 5 倍にまで上昇した(Fig.22B, C)。以上の結果から、*Saa3* 遺伝子の -314/+50 の promoter 領域は、マクロファージとの相互作用に鋭敏に応答する element を含んでいると考えられた。

#### 4-3-4. *Saa3-luc* mouse の樹立および高脂肪食負荷による *in vivo* イメージング解析

*Saa3* 遺伝子の promoter 活性に基づく化学発光を可視化する際に、promoter 活性の組織特異性が求められる。*Saa3* 遺伝子はマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞で発現が誘導される脂肪細胞由来の遺伝子であり、かつ肥満時の脂肪組織において特異的に誘導されることが望まれる。*Saa3* 遺伝子の肥満脂肪組織における詳細な発現解析を行うために、*db/+*および *db/db* マウス (n=3) から肝臓 (liver)、腎臓 (kidney)、大腸 (colon)、小腸 (intestine)、骨格筋 (skeletal muscle)、心臓 (heart)、脾臓 (spleen)、精巣 (testis)、白色脂肪組織 (white adipose) の各組織を摘出し、total RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を作製した。各組織における *Saa3* mRNA の発現量を解析したところ、肥満脂肪組織特異的に有意な発現量の増加が認められた (Fig.23)。以上の結果から、*Saa3* 遺伝子は肥満誘導時に脂肪組織特異的に promoter 活性が上昇し、かつ活性化マクロファージに鋭敏に応答して転写活性が著しく上昇することから、イメージングモデルへ応用する最適な候補遺伝子であると想定した。マイクロインジェクション法によって *Saa3-luc* キメラ遺伝子をマウス受精卵へ導入し、*Saa3-luc* mouse を樹立した。得られた 89 匹の仔のゲノム解析によってイメージングに用いる 10-3 系統の Tg マウスを選抜した。C57Bl/6J マウスとの戻し交配によって得られた F3 世代の雄性マウスを用いて高脂肪食負荷試験を行った。正常食群と高脂肪食群の 2 群に分け (n=3)、高脂肪食群は、高脂肪食を 16 週間与え肥満を誘導した。D-luciferin を 150 mg/kg の濃度でマウス腹腔内に投与した後、Night OWL II (Berthold 社製) によって *in vivo* イメージング解析を行った結果、高脂肪食群においてのみ、白色脂肪組織周囲に高い化学発光量が観察された (Fig.24A)。さらに、イメージング解析後、マウスを屠殺し、脂肪組織、肝臓、大腸、小腸、腎臓、骨格筋を摘出し、各組織の *luciferase* 活性を測定した。その結果、高脂肪食群の脂肪組織においてのみ *luciferase* 活性の有意な上昇が認められたことから (Fig.24B)、イメージング解析によって観察された化学発光は、脂肪組織由来である可能性が考えられた。

#### 4-4. 考察

脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用によって脂肪組織の持続的な軽度慢性炎症が惹起され、インスリン抵抗性などの全身の代謝不全が生じる。近年では、肥満時の脂肪組織の慢性炎症の抑制や予防を指向した機能性食品や医薬品の開発が推進されているが、特に、日常の食環境の改善は肥満に伴う病態発症を予防しうる点でも極めて重要である。本章では、脂肪組織へのマクロファージ浸潤量を反映する脂肪細胞由来の遺伝子の単離を試み、肥満時の脂肪組織の慢性炎症像を非侵襲的に可視化する新たな動物評価モデルの作製を目指した。*in vivo*における脂肪組織で顕著に発現増加する遺伝子群と *in vitro* 共存培養によって活性化マクロファージに応答して脂肪細胞において著しく発現増加する遺伝子群との比較解析を行った。本章では、第1章および第3章で単離した候補因子の選抜法とは異なり、イメージング解析を実施する際に遺伝子の promoter 強度の強さが問題になると想定し、マクロファージの浸潤に関連して脂肪細胞において5倍以上と著しく発現が誘導される因子群を選抜し、候補遺伝子15個を単離した。さらには、肥満時における各組織において、候補遺伝子の発現解析を実施し、*Saa3*や *Timp1*、*Il-1rn* の mRNA 発現量が肥満脂肪組織特異的に増加することを見出したことから、この3遺伝子を、白色脂肪組織へのマクロファージの浸潤量のモニターに適した脂肪細胞由来の候補遺伝子として着目した。一方で、他の候補遺伝子に関しては、マクロファージとの相互作用に応答して脂肪細胞において発現量が増加することも考えられたが、全身において高い mRNA の発現が観察されたことから、全身において高発現していると考えられ、肥満白色脂肪組織のイメージングを目指す上では不向きであると結論した。さらに、脂肪細胞における *Saa3* 遺伝子の転写量は、活性化マクロファージとの相互作用によって、78倍と高い上昇率を示し、この上昇率は、他の候補遺伝子と比較して最も高かったことから、*Saa3* 遺伝子の promoter 活性は、マクロファージの浸潤に鋭敏に応答していると想定した。さらに重要なことに、*Saa3* mRNA の発現量は、非肥満マウスの脂肪組織と比較して遺伝性肥満マウス、または食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織において有意に増加し、肥満脂肪組織における *Saa3* mRNA の発現量は、脂肪組織へのマクロファージの浸潤量の指標である F4/80(+)陽性細胞数と正に相関していた。さらには、collagenase 処理によって脂肪組織を酵素分散し、得られた成熟脂肪細胞画分、および SVF における *Saa3* 遺伝子の発現解析を行った結果、両画分において *Saa3* 遺伝子の発現は観察されたが、正常なマウスから単離した SVF と比較して、肥満マウスから単離した SVF において発現量の増加は認められなかった（データ非掲載）。一方で、正常なマウスから単離した成熟脂肪細胞と比較して、肥満マウスから単離した成熟脂肪細胞において *Saa3* mRNA の発現量が増加したことから、肥満脂肪組織における *Saa3* の発現量の増加は、マクロファージの脂肪組織への浸潤に応答して脂肪細胞において発現増加する脂肪細胞由来の遺伝子であることが示された。以上の結果から、肥満脂肪組織の慢性炎症を反映するレポーターマウスの作出において、

*Saa3* 遺伝子は、マクロファージの浸潤量をモニターしうる最適な脂肪細胞由来の遺伝子であると結論した。

*Saa3* 遺伝子は、炎症反応に応答して産生される急性期炎症タンパク質である SAA family の一つとして従来から知られ[128]、関節リウマチや動脈硬化症、肥満などの慢性炎症疾患において mRNA の発現量が増加することが明らかにされた[129–132]。*Saa1* や *Saa2* などの他の family 遺伝子は、急性期炎症において、主に肝臓で誘導される一方で、*Saa3* 遺伝子は、脂肪組織や肺、大腸組織など、肝臓組織以外で高発現する。さらには、脂肪細胞における *Saa3* 遺伝子は、飽和脂肪酸や IL-1 $\beta$ 、低酸素刺激など、種々の炎症誘導性の刺激によって誘導されることが *in vitro* において示されているが[129,133]、本研究によって、脂肪組織に浸潤するマクロファージとの相互作用によって *Saa3* 遺伝子は発現増加することを明らかにした。さらには、*Saa3* 遺伝子の-314/+50 領域の promoter 活性は、活性化マクロファージとの共存培養または、培養上清による刺激によっても著しく上昇することを明らかにし、肥満脂肪組織における慢性炎症において、SAA3 はマクロファージの浸潤量の増加に関連して脂肪細胞において産生量が増加することで病態発症に関与していると考えられた。一方で、肥満マウスの血中の SAA 濃度の増加には、SAA3 の発現増加は寄与しないことが明らかにされ、SAA3 は、マクロファージの浸潤によって脂肪細胞において産生され、脂肪組織 local に慢性炎症の発症に関与していると考えられた。

Van de Loo らは以前、関節リウマチの発症過程における関節滑膜において、発現変動する遺伝子を継時的、かつ網羅的に探索を行い、疾患の重症度と最も密接に関連して転写活性が上昇する遺伝子として *Saa3* 遺伝子に着目し[127]、さらには、*Saa3* 遺伝子の promoter 領域 (-314/+50) は、マウスおよびヒトの滑膜線維芽細胞において IL-1 $\beta$  などのサイトカイン刺激によって活性化され、その promoter 強度が高いことが示された[130]。注目すべきことに、promoter 領域に、CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (CEBP/ $\beta$ )-binding sites が豊富に存在している遺伝子は、その発現量とコラーゲン誘導性関節炎の重症度とに正の相関を示すことが明らかにされた[127]。本研究において、マクロファージの浸潤量を鋭敏に反映する脂肪細胞由来の候補因子として単離した *Saa3* 遺伝子の promoter 領域 (-314/+50) は、3つの CEBP/ $\beta$ -binding sites が存在していることを明らかにし、活性化マクロファージとの共存培養に反応してその転写活性が増加することを見出している (データ非掲載)。すなわち、マクロファージの浸潤量を鋭敏に反映している *Saa3* 遺伝子の promoter 活性の上昇は、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において活性化される CEBP/ $\beta$  の活性化によって制御されており、肥満脂肪組織の慢性炎症の重症度の指標となりうると考えられた。極めて最近、*Cebp $\beta$*  は、IL-6、IL-1、TNF- $\alpha$  などの炎症刺激によって転写活性が増加することが示され、肥満の進行における炎症反応シグナルにおける CEBP/ $\beta$  の役割が注目された[134–136]。肥満モデル *d b l d b* マウスにおいて *Cebp $\beta$*  を欠損させることで、肥満症や

肝硬変、さらには糖尿病などの代謝異常が改善された[135]。さらには、Rahman らによって *Cebp $\beta$*  の欠損マウスの骨髄を正常マウスに移植する実験が行われ[137]、*Cebp $\beta$*  の欠損マウスの骨髄を移植したレシピエントマウスでは、高脂肪食負荷による肥満誘導に対して脂肪組織のマクロファージ数の減少や炎症性サイトカインの低下、さらにはインスリン感受性の改善が認められた。これらの成果によって、脂肪組織におけるマクロファージの **CEBP $\beta$**  が脂肪組織の慢性炎症の発症において重要な役割を担うことが示唆されたが、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において活性化する **CEBP $\beta$**  の役割は不明である。一方で、*Cebp $\beta$*  siRNA を 3T3-L1 脂肪細胞に導入し、*Cebp $\beta$*  をロックダウンした細胞では、パルミチン酸刺激による **NF- $\kappa$ B** の活性化が抑制されていることが示され、逆に、アデノウイルス法による 3T3-L1 細胞および RAW 細胞への **CEBP $\beta$**  の過剰発現は、**NF- $\kappa$ B** を活性化させた[137]。これらの研究は、**CEBP $\beta$**  は、飽和脂肪酸の存在下で **NF- $\kappa$ B** の転写活性を増加させることを示唆しており、脂肪組織の慢性炎症の発症において、脂肪細胞の **CEBP $\beta$**  は、標的遺伝子の転写活性を高めるのみならず、**NF- $\kappa$ B** のような他の転写因子と協調して脂肪細胞の遺伝子の発現を調節し、慢性炎症や全身の代謝異常に重要な役割を担っていることが示唆された。一方で、本研究において、3T3-L1 細胞における *Saa3* 遺伝子の promoter 領域 (-314/+50) は、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  の刺激によって活性化されることを示したが、実際に、**NF- $\kappa$ B** 結合サイトが領域内に存在し、promoter 活性の増加に関与しているのかどうかは不明である。今後、*Cebp $\beta$*  siRNA の導入や **CEBP $\beta$ -binding sites** に点突然変異を導入したコンストラクトを作製するなど、脂肪細胞における **CEBP $\beta$**  の生理機能の解明が求められる。マクロファージとの相互作用によって活性化する脂肪細胞における **CEBP $\beta$**  の役割が明らかとなれば、*Saa3* 遺伝子の promoter 活性を制御する **CEBP $\beta$**  の活性化が、マクロファージの浸潤によって引き起こされる慢性炎症の重要な指標となりうるとともに、**CEBP $\beta$**  を指標とした慢性炎症の解明を進めることで、新たな治療薬の開発に繋がると期待された。

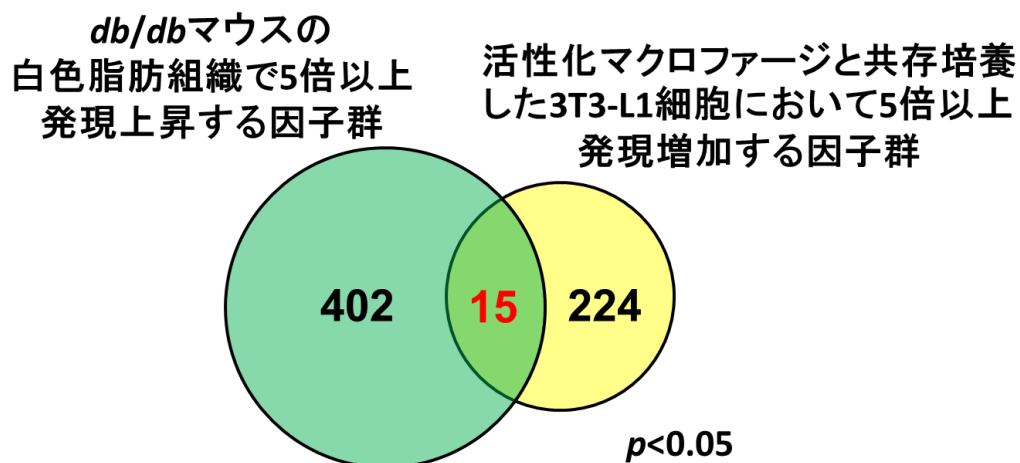
以前に、炎症性の転写因子である **NF- $\kappa$ B** の制御下において *Luciferase* 遺伝子が発現するトランスジェニックマウス (**NF- $\kappa$ B-luc mouse**) が作出され、炎症像の可視化が試みられた[124]。**NF- $\kappa$ B-luc mouse** は、LPS 投与によってリンパ節や胸腺において高い化学発光が観察され、さらに Calsen らは、高脂肪食を与え肥満を誘導した **NF- $\kappa$ B-luc mouse** において非侵襲的に生体内の **NF- $\kappa$ B** の活性化の観察を行った。高脂肪食を摂取させたマウスでは、全身において **NF- $\kappa$ B** の活性化に基づく化学発光が観察され、特に、胸部の領域において高い発光が観察された[125]。以上の結果から、**NF- $\kappa$ B-luc mouse** は、炎症誘導時における全身での **NF- $\kappa$ B** 活性化の生理機能を探索する有益なモデルマウスとなりうると考えられた一方で、**NF- $\kappa$ B-luc mouse** は、脂肪組織の慢性炎症の特異的な観察には不向きであった。さらには、3T3-L1 細胞に **NF- $\kappa$ B luc** を安定的に発現させた安定形質転換細胞を、マウスに移植し、高脂肪食を与えた際の化学発光の観察も

試みられたが、*in vivo*における慢性炎症に対する脂肪細胞の生理的な役割を反映しているとは言い難く、これまでに脂肪組織の慢性炎症を評価するモデルマウスは開発されていない。本研究では、脂肪組織の慢性炎症の可視化を目指し *Saa3* 遺伝子の promoter 領域 (-314/+50) を *luciferase* 遺伝子に連結したキメラ遺伝子 *Saa3-luciferase* (*saa3-luc*) を構築し、トランスジェニックマウス (*Saa3-luc mouse*) の作出を行った。実際に、*Saa3-luc mouse* に高脂肪食を負荷し、肥満を誘導した際の *in vivo* イメージング解析を行った結果、高脂肪食を摂取した *Saa3-luc mouse* においてのみ白色脂肪組織に相当する領域に化学発光を認めた。さらには、*Saa3-luc mouse* の主要な組織を摘出し、*in vitro* での *luciferase* 活性を測定した結果、肥満脂肪組織において *luciferase* 活性の有意な上昇を確認した。すなわち、*Saa3* 遺伝子の promoter 活性は、肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤量の指標として利用でき、*Saa3-luc mouse* は、肥満脂肪組織の慢性炎症像を非侵襲的に評価しうるモデルマウスとして捉えることが出来ると考えられた。一方で、有意な差は認められないが、大腸や小腸などの消化管組織においても *luciferase* の発現が一部観察された。これは、*Saa3* 遺伝子は脂肪細胞のみならず、マクロファージなどの免疫細胞や消化管上皮細胞など、全身の組織においても少なからず発現している可能性を示唆し、*in vivo* イメージングによって観察された化学発光が真に脂肪組織由来であるか、さらには脂肪細胞において *luciferase* が誘導されているかについてはさらなる解析が必要であると考えられた。本研究で作出した *Saa3-luc mouse* は、脂肪組織に浸潤するマクロファージに応答して脂肪細胞で転写活性が上昇する promoter 活性に基づく化学発光を検出している点で、従来の NF- $\kappa$ B の活性化に基づく評価モデルマウスとは異なり、脂肪組織の慢性炎症の成因を評価出来うると考えた。

本章では、脂肪組織へ浸潤したマクロファージが局所的に産生する TNF- $\alpha$  によって、肥満脂肪組織特異的に *luciferase* 活性の増加が引き起こされている可能性が示され、*Saa3* 遺伝子の promoter 活性の定量化は、脂肪組織内に浸潤するマクロファージ量に関連した慢性炎症状態を観察する上で有効であると考えられた。一方で、TLR4 の内在性のリガンドである SAA3 は、TLR4 を介した炎症シグナルのカスケードにおける役割が注目されており [138]、以前の研究では、SAA3 は、転移前の肺において S100A8 や S100A9 によって発現誘導され、TLR4 依存的に MCP-1 などの遊走因子の分泌を促進する正のフィードバックループ調節因子として機能し、ミエロイド細胞の蓄積において重要な役割を果たしていることが示唆された [138]。さらには、最近の研究によって、SAA3 はマウスにおいて NLRP3 インフラマソームの活性化や、アレルギー喘息の発症を促進することが示されるなど [139]、SAA3 は様々な疾患の病態発症の過程において重要な役割を担うことが報告されている。本研究で確立した *Saa3-luc mouse* は、肺組織のみならず癌の転移時に発現量が増加する *Saa3* 遺伝子の promoter 活性を指標として、癌細胞の転移を観察するモデルとして応用が可能であることが示唆された。また、NLRP3 インフラマソームの活性化は、癌やアルツハイマーなどの種々の疾患の病態発

症に関与することが報告されていることから、*Saa3* 遺伝子の promoter 活性を評価の指標として非侵襲的にインフラマソーム活性化の評価が可能となれば、アルツハイマー病などに対する新しい動物評価モデルとして提案できると考えられた。さらには、本研究によってマクロファージの浸潤量を反映する因子として単離した *Saa3* 遺伝子は、肥満脂肪組織において発現が誘導されることを示した一方で、アジュバンド関節炎を誘導した関節滑膜細胞において重症度のマーカーとなることが示されている[127,130]。また、当研究室の山本らによって dextran sulfate sodium (DSS) による薬剤誘導性の大腸誘モデルマウスの大腸においても *Saa3* 遺伝子は顕著に増加することが明らかにされた。一般的な大腸炎モデルマウスの評価基準は、目視による出血や糞便状態による主観的な評価が行われているが、山本らは、*Saa3* 遺伝子が大腸炎の有望なマーカーとなりうる予備データを既に得ており、*Saa3-luc mouse* を用いた大腸炎の非侵襲的な評価が可能となれば、従来までの DSS 大腸炎の評価方法では明確に示されなかった急性炎症の開始部位や開始時期、さらに機能性素材による炎症の抑制効果などリアルタイムな解析が可能となるなど、大腸炎の評価において極めて貴重な情報を与えるものと想定される。先に記したように、*Saa3* 遺伝子は関節リウマチの有望なマーカーとなりうることも示されており、*Saa3-luc mouse* は関節リウマチ炎の評価モデルとしての確立も想定されるなど、多様な炎症性疾患が社会問題となっている現代において *Saa3-luc mouse* は特徴的な評価系として重要な意義を持つと考えられる。

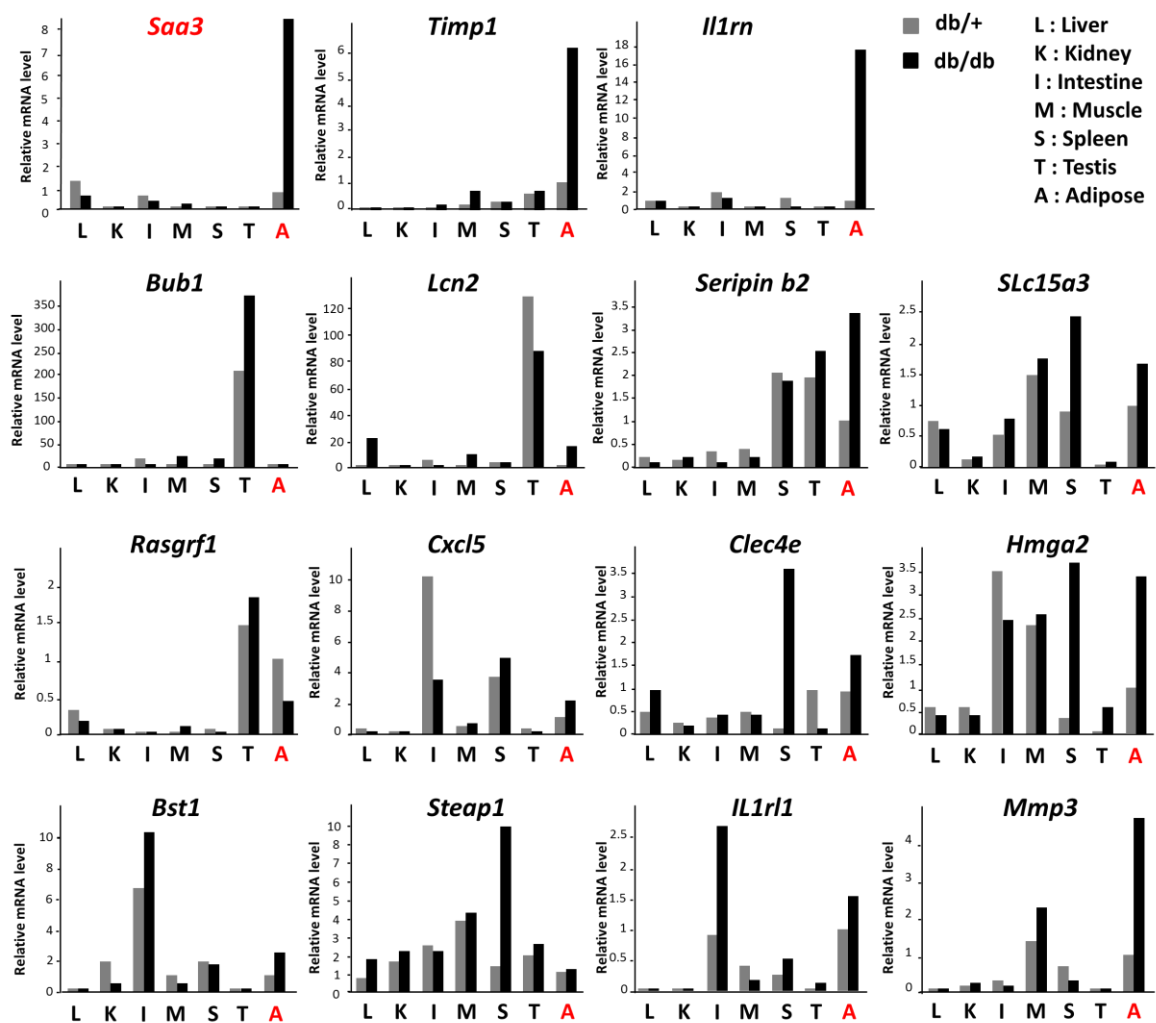
#### 4-5. 図表



**Fig.17** *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現上昇する因子群とマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において著しく発現上昇する因子群との比較解析

遺伝性肥満 *db/db* マウスの白色脂肪組織において 5 倍以上発現が増加した 420 遺伝子と活性化マクロファージとの共存培養によって 5 倍以上発現が増加する 224 遺伝子との比較解析によって 15 個の因子群を選抜した。





**Fig.18** 候補遺伝子の各組織における mRNA の発現解析

遺伝性肥満 *dbl/db* マウス、および非肥満マウス *db+/+* マウスから肝臓 (Liver)、腎臓 (Kidney)、小腸 (Intestine)、骨格筋 (Muscle)、脾臓 (Spleen)、精巣 (Testis) および白色脂肪組織 (Adipose) の各組織を摘出し、抽出した total RNA を用いて候補遺伝子の mRNA 発現解析を実施した。15 候補遺伝子のうち、*Saa3*、*Timp1*、*Il-1rn* 遺伝子の mRNA 発現量は、*dbl/db* マウスの白色脂肪組織において特異的に増加した。

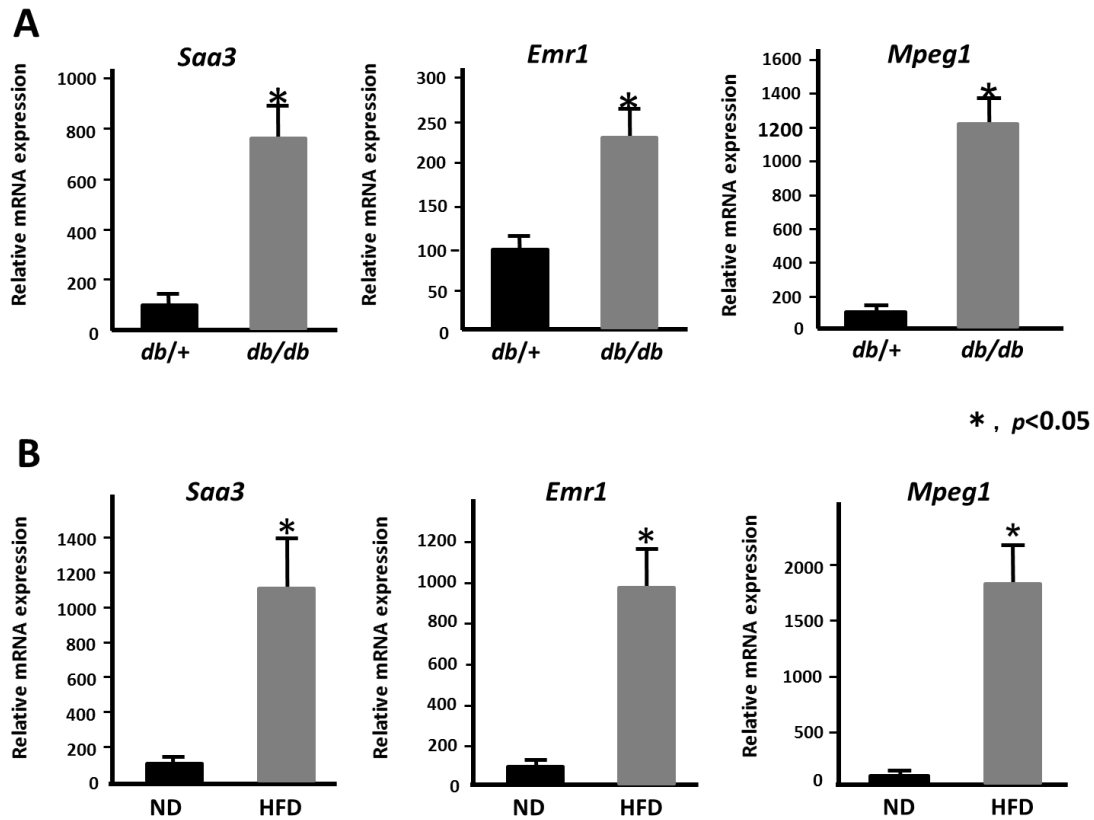
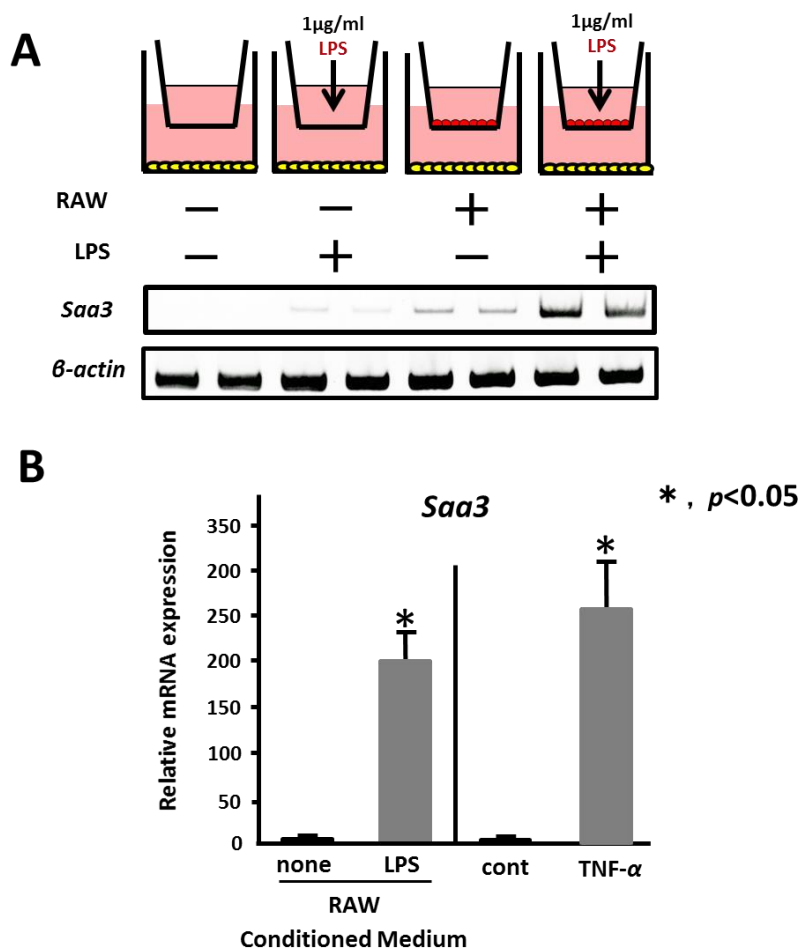


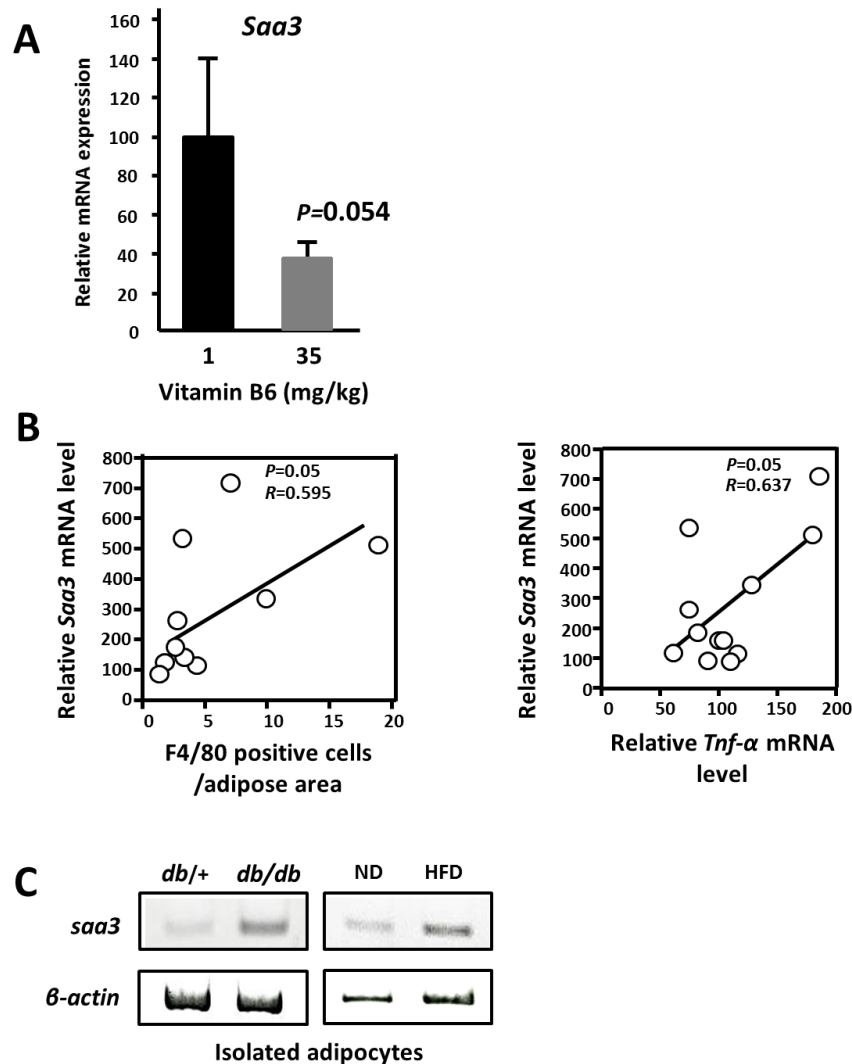
Fig.19 精巣周囲白色脂肪組織における *Saa3* 遺伝子の発現解析

*db/db* マウスおよび野生型 *db/+*マウスの脂肪組織から mRNA を抽出し、*Saa3* 遺伝子の発現量を real-time-PCR 法にて定量解析を行った。さらには、マクロファージのマーカー遺伝子である *Emr1* および *Mpeg1* 遺伝子の発現を解析した。同様に、食餌性肥満マウスおよび正常食摂取マウスの白色脂肪組織から mRNA を real-time-PCR 法にて遺伝子発現量を定量した。食餌誘導性肥満および遺伝性肥満マウスの脂肪組織において、マクロファージマーカー遺伝子は有意に増加しておりマクロファージ浸潤量の増加を確認した。*Saa3* 遺伝子の発現量は、対象群と比較して、*db/db* マウスにおいて 8 倍、食餌誘導肥満マウスにおいて 10 倍以上と、肥満に伴って顕著に発現増加することが示された。



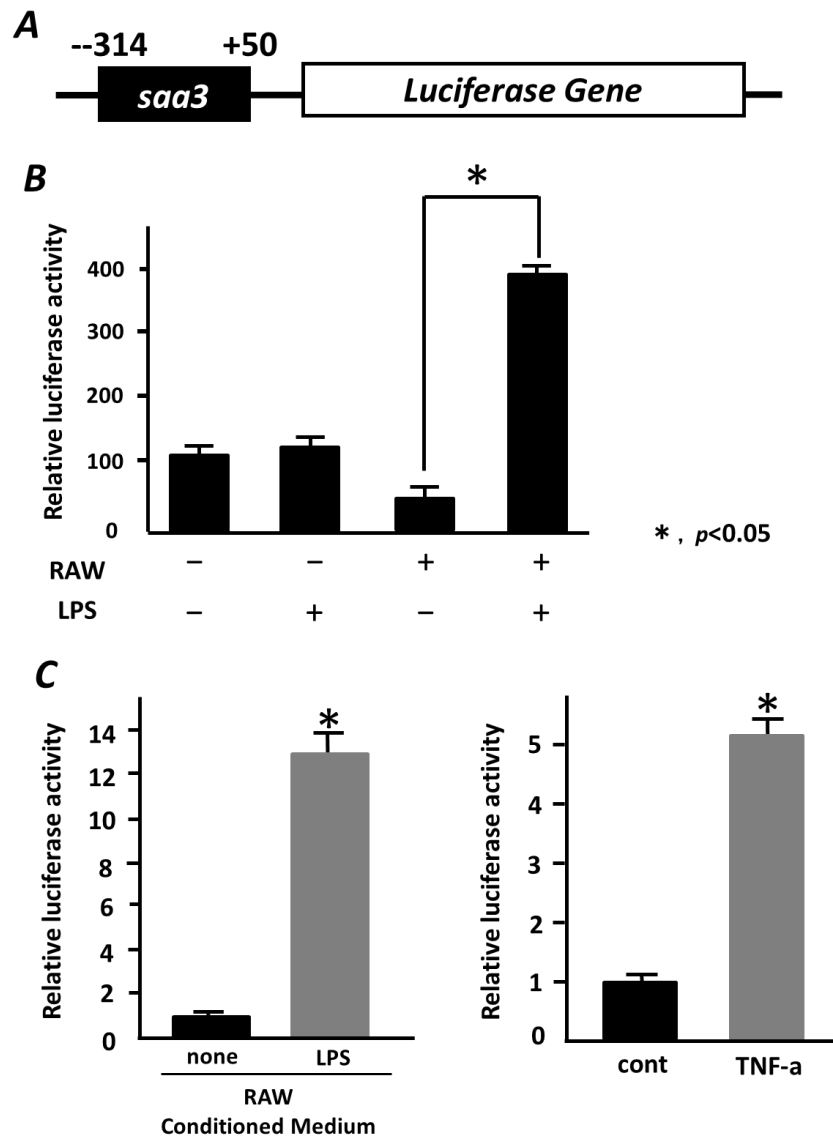
**Fig.20** マクロファージと脂肪細胞との共存培養系による *Saa3* 遺伝子の発現解析

*dbl/db* マウスおよび野生型 *dbl/+*マウスの脂肪組織から mRNA を抽出し、*Saa3* 遺伝子の発現量を real-time PCR 法にて定量解析を行った。さらには、マクロファージのマーカー遺伝子である *Emr1* および *Mpeg1* 遺伝子の発現を解析した。同様に、食餌性肥満マウスおよび正常食摂取マウスの白色脂肪組織から mRNA を real-time-PCR にて遺伝子発現量を定量した。食餌誘導性肥満および遺伝性肥満マウスの脂肪組織において、マクロファージマーカー遺伝子は有意に増加しておりマクロファージ浸潤量の増加を確認した。*Saa3* 遺伝子の発現量は、対象群と比較して、*dbl/db* マウスにおいて 8 倍、食餌誘導肥満マウスにおいて 10 倍以上と、肥満に伴って顕著に発現増加することが示された。



**Fig.21** マクロファージの浸潤に関連する *Saa3* 遺伝子の脂肪組織における発現解析

1 mg/kg および 35 mg/kg vitamin B6 摂取マウスの白色脂肪組織における発現解析の結果、35 mg/kg 摂取させたマウス (n=12) において *Saa3* の mRNA の発現量の低下を示した (A)。real-time PCR 法によって肥満脂肪組織の *Saa3* および *Tnf-α* の発現量を定量化し、一方でマクロファージマーカーである F4/80 抗体を用いた組織免疫染色によってマクロファージ数を数値化した。*Saa3* の発現量と両指標の相関の有無を Pearson 積率相関分析によって解析した (B、C)。collagenase による酵素分散を用いて *db/+*、および肥満 *db/db* マウスおよび正常食摂取マウスおよび高脂肪食摂取マウスの白色脂肪組織から成熟脂肪細胞画分および SVF を単離し、*Saa3* の発現量を RT-PCR によって解析した (D)。



**Fig.22** マクロファージとの相互作用によって活性化する *Saa3* 遺伝子の promoter 領域 (-314/+50) の解析

*Saa3* 遺伝子の promoter (-314/+50) 領域を単離し、*luciferase* 遺伝子を連結した *saa3-luciferase* キメラ遺伝子のコンストラクトを作製した (A)。*Saa3-luciferase* キメラ遺伝子を保持する *Saa3-luc* 安定形質転換 3T3-L1 細胞を樹立し、RAW 細胞との共存培養に供するとともに、TNF- $\alpha$  刺激を行った後、*luciferase* 活性を測定した。活性化した RAW 細胞との共存培養における *luciferase* 活性は有意に上昇した (B, C)。さらに、炎症性メディエーターである TNF- $\alpha$  による刺激によってもコントロールと比較して *luciferase* 活性は有意に上昇した (D)。

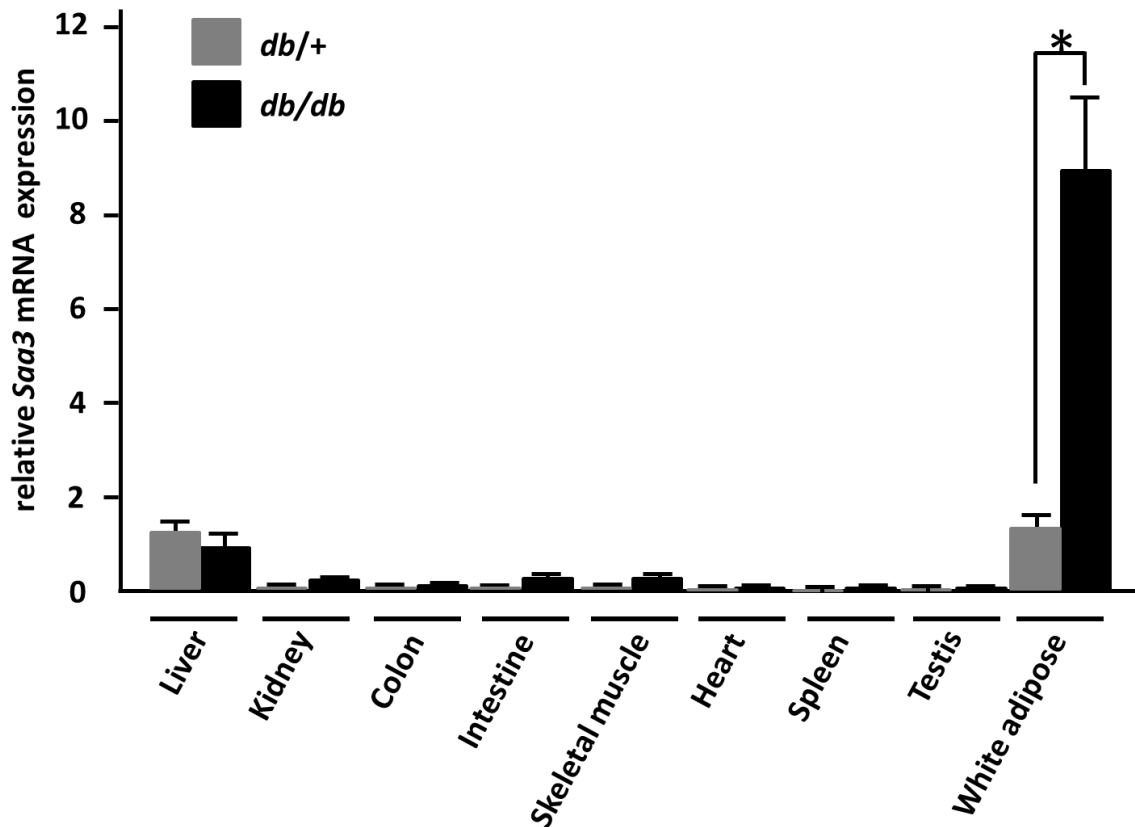
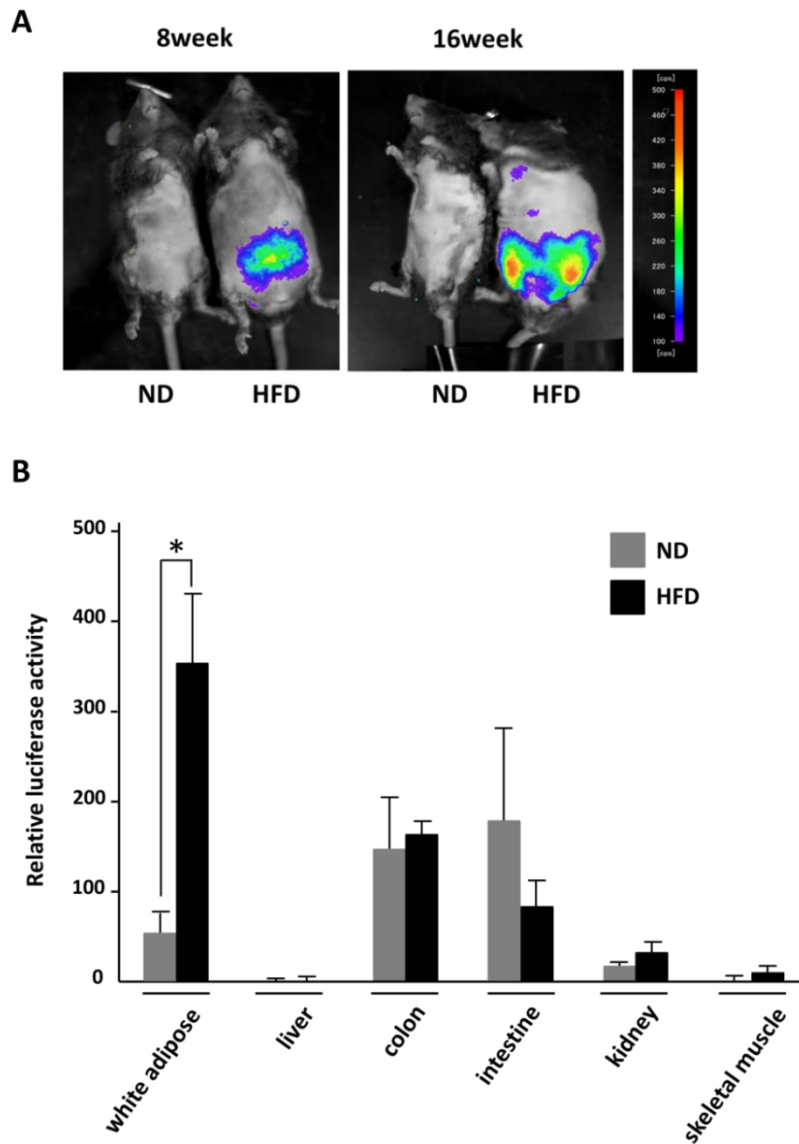


Fig.23 *db/+*および *db/db* マウスの各組織における *Saa3* mRNA 発現量の解析

*db/+*および *db/db* マウス (n=3) から肝臓 (Liver)、腎臓 (Kidney)、大腸 (Colon)、小腸 (Intestine)、骨格筋 (Skeletal muscle)、心臓 (Heart)、脾臓 (Spleen)、精巣 (Testis)、白色脂肪組織 (White adipose) の各組織を摘出し、total RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を作製した。*Saa3* mRNA 発現量を各組織において解析したところ肥満脂肪組織特異的に有意に発現増加した。



**Fig. 24 Saa3-luc mouse の高脂肪食負荷によるイメージング解析**

5週齢の Saa3-luc mouse を 2 群に分け、通常食を摂取する対照群に対して、試験群には高脂肪食を与え、食餌誘導性の肥満を誘導した。高脂肪食を 16 週間摂取させ、150 mg/kg の濃度で D-luciferin を腹腔内投与した後、*in vivo* イメージング解析を行った。イメージングには、Night OWL II (Berthold 社製) を使用し、高脂肪食によって肥満を誘導したマウスにおいてのみ化学発光が観察された (A)。イメージング解析後、マウスを屠殺し、主要な組織を摘出して *in vitro* において luciferase 活性を測定した結果、肥満脂肪組織特異的に luciferase 活性の上昇を確認した (B)。

## 総合考察

本研究では、メタボリックシンドロームの基盤病態である白色脂肪組織の慢性炎症の発症機序の解明を目指し、肥満時に脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用を *in vivo* において解析し、特に、マクロファージの浸潤によって脂肪細胞において発現変動することで病態発症に関与する脂肪細胞由来の因子の同定を行った。第1および第2章では、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現量が増加することで全身の代謝異常に関わる因子として *Ptx3* や *Ikke* を単離した。一方で、第3章では、マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において機能が低下することで肥満の病態発症に関わる因子の単離を試み、脂肪細胞の寿命に関連する因子として *Rassf6* を明らかにした。さらに第4章では、肥満脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価する新規の病態評価モデルの構築を目指し、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤量をモニターする脂肪細胞由来のマーカー遺伝子として *Saa3* 遺伝子を同定し、その promoter 活性を利用した *in vivo* イメージング解析を実施し、肥満白色脂肪組織の慢性炎症の非侵襲的な評価を可能とした。

本研究によって、肥満白色脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用の *in vivo* における解析を可能とし、マクロファージの浸潤によって引き起こされる脂肪細胞の形質変化には、マクロファージの分泌する TNF- $\alpha$  を介するシグナル伝達経路の活性化が重要な病態シグナルであることが示された。一方で、肥満の慢性炎症の発症において炎症性の転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化が重要な役割を担うと考えられていたが、本研究においてマクロファージの浸潤に応答する脂肪細胞由来のマーカー遺伝子として単離した *Saa3* 遺伝子は、その promoter 領域における CEBP $\beta$  を介した制御機構が重要な役割を担うことが示唆された。従来から知られている NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路に加え、CEBP $\beta$  を介したシグナル伝達経路が肥満白色脂肪組織の慢性炎症の発症において重要な役割を担うと想定されたが、CEBP $\beta$  は、NF- $\kappa$ B を含む他の転写因子と独立した調節機構を有しているのか、または協調的に働くことで肥満の病態発症に関与しているかについてはさらなる解析が求められる。本研究で単離したマクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において発現量が増加した因子群の promoter 解析を幅広く実施することで、肥満白色脂肪組織の慢性炎症の発症における CEBP $\beta$  の役割の解明につながるとともに、慢性炎症の新規の治療標的としての可能性が示された。また、NF- $\kappa$ B の活性化に関わるシグナル伝達因子である *Ikke* の発現量が増加したことは、IKK $\epsilon$  の標的因子である NF- $\kappa$ B や IRF3 の活性化を介して産生量が増加した炎症性サイトカインなどが autocrine 的に脂肪細胞に作用して、さらなる NF- $\kappa$ B の活性化を介して *Ikke* の発現量が増加する遺伝子発現の増幅の loop が考えられた。一方で、脂肪細胞における CEBP $\beta$  の活性化には、タンパク質リン酸化が重要となる実験データを得ており、従来から知られている ERK1/2 を介する CEBP $\beta$  のタンパク質リン酸化



に加え、マクロファージとの相互作用によって発現量が増加する IKK $\epsilon$  を介する直接的な CEBP/ $\beta$  タンパク質リン酸化による活性化の制御機構も想定された。本研究によって、マクロファージの浸潤によって引き起こされる脂肪組織の慢性炎症では、脂肪細胞の TNF- $\alpha$ - IKK $\epsilon$ - NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に加えて、TNF- $\alpha$ - IKK $\epsilon$ -CEBP/ $\beta$  のシグナル伝達経路の存在も想定され、マクロファージの浸潤に関連する脂肪細胞由来の遺伝子として単離した *Ptx3* や *Rassf6* などの遺伝子群の発現制御機構としての関連性も示唆された。

本研究において vitamin B6 (B6) は、脂肪組織へのマクロファージの浸潤を抑制し、肥満脂肪組織の慢性炎症を軽減する機能を有する食品栄養素としての新たな一面を示した。B6 を脂肪細胞へ直接作用させた *in vitro* 試験では、マクロファージとの相互作用による脂肪細胞の炎症反応を軽減しなかったことから、B6 は、脂肪組織へのマクロファージの浸潤量を減少させた結果、脂肪細胞における炎症反応の活性化を抑制したと考えられた。実際に高 B6 摂取マウスの脂肪組織では、B6 活性体の濃度が上昇していることも以前に示されており、B6 は脂肪組織内において脂肪細胞に直接的に作用しているのか、または脂肪組織内の他細胞への影響を介してマクロファージの浸潤を抑制しているのかについてはさらなる解析が必要である。一方で、マクロファージの浸潤による脂肪組織の慢性炎症の発症において、脂肪細胞の CEBP/ $\beta$  の活性化が重要な病態シグナルである可能性を示したが、脂肪細胞に直接作用し、CEBP/ $\beta$  の活性化を抑制することで慢性炎症を軽減する食品素材の存在も想定され、マクロファージの浸潤を鋭敏に反映する *Saa3* 遺伝子の promoter 活性は、マクロファージとの相互作用による CEBP/ $\beta$  の活性化が重要であることから、*Saa3* 遺伝子の promoter 活性を指標とした機能性食品成分のスクリーニングが可能であり、マクロファージと脂肪細胞との病態シグナルを標的とした脂肪組織の慢性炎症を抑制する新規の機能性素材の探索にもつながると考えられた。

本研究では、脂肪組織の慢性炎症の解明を目指し、脂肪組織に浸潤するマクロファージと脂肪細胞との相互作用による病態シグナリングを *in vivo* において解析し、マクロファージの浸潤によって脂肪細胞において引き起こされる新たな病態メカニズムが提案された。さらには、*Saa3* 遺伝子の promoter 活性を利用して確立した非侵襲性の動物評価法は、肥満形成早期にマクロファージの白色脂肪組織内への浸潤に鋭敏に応答し、白色脂肪組織の慢性炎症の発症、かつ病態進行をリアルタイムに解析できるなど、機能性食品などの評価モデルとしての利用のみならず、肥満研究の基礎分野においても広く利用される革新的な動物評価系となりうるものである。一方で、*Saa3-luc mouse* に高脂肪食を負荷し肥満を誘導した際に、消化管を含む他の組織において観察された luciferase の発現は、限定した promoter 領域 (-314/+50) を利用したことに基づくと考えられ、イメージング解析による肥満脂肪組織の慢性炎症の可視化においては欠点であると考えられた。本モデルマウスが広く利用されうるためには、慢性炎症を反映する

脂肪組織特異的な luciferase の化学発光のみを観察可能とすることが必須となる。例えば、adiponectin 遺伝子の promoter の下流にリコンビナーゼ Cre を連結することで脂肪細胞特異的に発現する Cre mouse を作出し、一方、Saa3 遺伝子内に Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP を挿入することで、Saa3 遺伝子の支配下で luciferase が発現できるような Cre-loxP system を考案することも一例として考えられる。また、Saa3 遺伝子は、関節炎における滑膜細胞で発現が上昇する有効な病態マーカーであることや大腸炎の発症においても発現が上昇するなど、他の炎症性の病態マーカーとなりえる可能性を見出しており、本研究で作出した Saa3-luc mouse の他の炎症性疾患のモデルとして応用が期待できる点は、多様な炎症性疾患が問題となっている現代社会において貴重な研究ツールになりうると考えられた。さらには、イメージング解析を用いた病態の継続的な観察が可能となれば、使用実験動物数の削減や痛みの軽減などの低侵襲を実現することによって動物に優しい研究手法につながるなど、動物愛護問題に対する一つの解決策を提示する点でも社会的にも意義は大きいものと考えられる。

## 引用文献

1. Feingold KR, Soued M, Staprans I, Gavin LA, Donahue ME, Huang BJ, Moser AH, Gulli R, Grunfeld C (1989) Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. *J Clin Invest* **83**: 1116–1121.
2. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**: 87–91.
3. Teppo AM, Maury CP (1987) Radioimmunoassay of tumor necrosis factor in serum. *Clin Chem* **33**: 2024–2027.
4. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425–432.
5. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269**: 546–549.
6. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**: 543–546.
7. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**: 540–543.
8. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y (1999) Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* **38**: 202–206.
9. Matsuzawa Y, Shimomura I, Kihara S, Funahashi T (2003) Importance of adipocytokines in obesity-related diseases. *Horm Res* **60 Suppl 3**: 56–59.
10. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **95**: 2409–2415.
11. Vaughan DE (2005) PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* **3**:

- 1879–1883.
12. Massira F (2001) Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* **15**: 2727–2729.
  13. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G, Teboul M (2001) Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* **142**: 5220–5225.
  14. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 286–289.
  15. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoaka K, et al. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 79–83.
  16. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T (2004) Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* **68**: 975–981.
  17. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, et al. (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **100**: 2473–2476.
  18. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I (2004) Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 29–33.
  19. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* **121**: 2094–2101.
  20. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS (2007) Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**: 2910–2918.
  21. Lee M-J, Wu Y, Fried SK (2010) Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**: 371–376.
  22. Bai Y, Sun Q (2015) Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes*

- Rev* **16**: 127–136.
23. Brestoff JR, Artis D (2015) Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell* **161**: 146–160.
  24. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* **112**: 1821–1830.
  25. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**: 1796–1808.
  26. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, et al. (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* **281**: 26602–26614.
  27. Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarh D, Mudgett J, Chen H, MacNeil DJ, Reitman ML, et al. (2005) Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res* **13**: 1311–1320.
  28. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* **116**: 115–124.
  29. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, et al. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* **116**: 1494–1505.
  30. Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG (2008) Ablation of CD11c-Positive Cells Normalizes Insulin Sensitivity in Obese Insulin Resistant Animals. *Cell Metab* **8**: 301–309.
  31. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**: 656–661.
  32. Nourshargh S, Alon R (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues.

- Immunity* **41**: 694–707.
33. Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* **23**: 344–346.
  34. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**: 958–969.
  35. Heilbronn LK, Campbell L V (2008) Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* **14**: 1225–1230.
  36. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* **46**: 2347–2355.
  37. Li P, Lu M, Nguyen MTA, Bae EJ, Chapman J, Feng D, Hawkins M, Pessin JE, Sears DD, Nguyen AK, et al. (2010) Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J Biol Chem* **285**: 15333–15345.
  38. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* **117**: 175–184.
  39. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* **56**: 16–23.
  40. Stienstra R, Duval C, Keshtkar S, Van Der Laak J, Kersten S, Müller M (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J Biol Chem* **283**: 22620–22627.
  41. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, et al. (2007) Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**: 1116–1120.
  42. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Iikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, et al. (2009) Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*

- 58**: 2574–2582.
43. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* **116**: 1784–1792.
  44. Wu D, Molofsky AB, Liang H-E, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM (2011) Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science (80- )* **332**: 243–247.
  45. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, et al. (2004) Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* **109**: 2046–2049.
  46. McNelis J, Olefsky J (2014) Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* **41**: 36–48.
  47. Mamane Y, Chung Chan C, Lavallee G, Morin N, Xu L-J, Huang J, Gordon R, Thomas W, Lamb J, Schadt EE, et al. (2009) The C3a anaphylatoxin receptor is a key mediator of insulin resistance and functions by modulating adipose tissue macrophage infiltration and activation. *Diabetes* **58**: 2006–2017.
  48. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, et al. (2009) CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* **15**: 914–920.
  49. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, et al. (2007) T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* **115**: 1029–1038.
  50. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson A-KL, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, et al. (2006) Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* **12**: 178–180.
  51. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, Fagarasan S, Mielke LA, Afshar-Sterle S, Masters SL, et al. (2015) The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development

- and maintenance of adipose tissue–resident regulatory T cells. *Nat Immunol* **16**: 276–285.
52. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, et al. (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* **15**: 921–929.
  53. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN, et al. (2011) B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* **17**: 610–617.
  54. de Almeida PE, van Rappard JRM, Wu JC (2011) In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**: H663–H671.
  55. Kelkar M, De A (2012) Bioluminescence based in vivo screening technologies. *Curr Opin Pharmacol* **12**: 592–600.
  56. Prescher JA., Contag CH (2010) Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Curr Opin Chem Biol* **14**: 80–89.
  57. Appel AA., Anastasio MA., Larson JC, Brey EM (2013) Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering. *Biomaterials* **34**: 6615–6630.
  58. O’Farrell A, Shnyder S, Marston G, Coletta P, Gill J (2013) Non-invasive molecular imaging for preclinical cancer therapeutic development. *Br J Pharmacol* **169**: 719–735.
  59. Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, Dusich J, Purchio T (2005) Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* **7**: R444–R454.
  60. Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, et al. (2012) In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr Biol* **22**: 1029–1034.
  61. Sekimoto R, Fukuda S, Maeda N, Tsushima Y, Matsuda K, Mori T, Nakatsuji H, Nishizawa H, Kishida K, Kikuta J, et al. (2015) Visualized macrophage dynamics and significance of S100A8 in obese fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E2058–E2066.



62. Luker KE, Luker GD (2010) Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Res* **86**: 93–100.
63. Moon WH, Kirksey A (1973) Cellular growth during prenatal and early postnatal periods in progeny of pyridoxine-deficient rats. *J Nutr* **103**: 123–133.
64. Chiang E-PI, Bagley PJ, Roubenoff R, Nadeau M, Selhub J (2003) Plasma pyridoxal 5'-phosphate concentration is correlated with functional vitamin B-6 indices in patients with rheumatoid arthritis and marginal vitamin B-6 status. *J Nutr* **133**: 1056–1059.
65. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, Meucci G, Spina L, de Franchis R (2003) Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenterol* **98**: 112–117.
66. Yanaka N, Koyama T-A, Komatsu S-I, Nakamura E, Kanda M, Kato N (2005) Vitamin B6 suppresses NF-kappaB activation in LPS-stimulated mouse macrophages. *Int J Mol Med* **16**: 1071–1075.
67. Yanaka N, Ohata T, Toya K, Kanda M, Hirata A, Kato N (2011) Vitamin B6 suppresses serine protease inhibitor 3 expression in the colon of rats and in TNF- $\alpha$ -stimulated HT-29 cells. *Mol Nutr Food Res* **55**: 635–643.
68. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y (2005) A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 2062–2068.
69. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, et al. (2007) Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 84–91.
70. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **116**: 3015–3025.
71. Gao D, Bing C (2011) Macrophage-induced expression and release of matrix metalloproteinase 1 and 3 by human preadipocytes is mediated by IL-1 $\beta$  via activation of MAPK signaling. *J Cell Physiol* **226**: 2869–2880.

72. Gao D, Madi M, Ding C, Fok M, Steele T, Ford C, Hunter L, Bing C (2014) Interleukin-1 $\beta$  mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**: E289–E304.
73. Molgat ASD, Gagnon A, Sorisky A (2011) Macrophage-induced preadipocyte survival depends on signaling through Akt, ERK1/2, and reactive oxygen species. *Exp Cell Res* **317**: 521–530.
74. Sanada Y, Kumoto T, Suehiro H, Nishimura F, Kato N, Hata Y, Sorisky A, Yanaka N (2013) RASSF6 Expression in adipocytes is down-regulated by Interaction with macrophages. *PLoS One* **8**: e61931
75. 末廣春奈 (2011) ビタミンB6の脂肪組織に対する新規生理作用探索 修士論文
76. Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**: 860–867.
77. Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS (2011) Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**: 738–749.
78. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, Krejsek J (2012) Pentraxin 3(PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. *Mediators Inflamm* **2012**: 920517.
79. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A (2006) Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **18**: 10–15.
80. Alberti L, Gilardini L, Zulian A, Micheletto G, Peri G, Doni A, Mantovani A, Invitti C (2009) Expression of long pentraxin PTX3 in human adipose tissue and its relation with cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* **202**: 455–460.
81. Basile A, Sica A, D’Aniello E, Breviario F, Garrido G, Castellano M, Mantovani A, Introna M (1997) Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. *J Biol Chem* **272**: 8172–8178.
82. Wu TC, Leu HB, Lin WT, Lin CP, Lin SJ, Chen JW (2005) Plasma matrix metalloproteinase-3 level is an independent prognostic factor in stable coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* **35**: 537–545.
83. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR (2014) Insulin receptor signaling in

- normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a009191–a009191.
84. Lee B-C, Lee J (2014) Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* **1842**: 446–462.
  85. Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor- $\kappa$ B -- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**: 1066–1071.
  86. Park M, Hong J (2016) Roles of NF- $\kappa$ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* **5**: 15.
  87. Brown KD, Claudio E, Siebenlist U (2008) The roles of the classical and alternative nuclear factor- $\kappa$ B pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **10**: 212.
  88. Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM (2005) Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* **54**: 2351–2359.
  89. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* **11**: 183–190.
  90. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* **11**: 191–198.
  91. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, Davis RJ (2013) JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* **339**: 218–222.
  92. Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky JM, et al. (2007) JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab* **6**: 386–397.
  93. Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S (1999) IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* **11**: 1357–1362.
  94. Peters RT, Liao S-M, Maniatis T (2000) IKK $\epsilon$  is part of a novel PMA-

- inducible I $\kappa$ B kinase complex. *Mol Cell* **5**: 513–522.
95. Peters RT, Maniatis T (2001) A new family of IKK-related kinases may function as I $\kappa$ B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1471**: M57–M62.
  96. Reilly SM, Chiang S-H, Decker SJ, Chang L, Uhm M, Larsen MJ, Rubin JR, Mowers J, White NM, Hochberg I, et al. (2013) An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK- $\epsilon$  improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat Med* **19**: 313–321.
  97. Chiang S-H, Bazuine M, Lumeng CN, Geletka LM, Mowers J, White NM, Ma J-T, Zhou J, Qi N, Westcott D, et al. (2009) The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice. *Cell* **138**: 961–975.
  98. Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, Du F, Ren J, Wu Y-T, Grishin N V, et al. (2015) Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* **347**: aaa2630.
  99. Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C (2013) Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* **15**: 659–667.
  100. Hui X, Gu P, Zhang J, Nie T, Pan Y, Wu D, Feng T, Zhong C, Wang Y, Lam KSL, et al. (2015) Adiponectin enhances cold-induced browning of subcutaneous adipose tissue via promoting M2 macrophage proliferation. *Cell Metab* **22**: 279–290.
  101. Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, Birsheim E, Radhakrishnan RS, Chao T, Ali A, Chondronikola M, Mlcak R, Finnerty CC, et al. (2015) Browning of subcutaneous white adipose tissue in humans after severe adrenergic stress. *Cell Metab* **22**: 219–227.
  102. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, et al. (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**: 366–376.
  103. Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, Palmiter RD, Chawla A (2014) Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**: 1292–1308.
  104. Molgat AS, Gagnon A, Sorisky A (2009) Preadipocyte apoptosis is prevented by macrophage-conditioned medium in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**: C757–C765.

105. Wang N, Ahmed S, Haqqi TM (2005) Genomic structure and functional characterization of the promoter region of human IkappaB kinase-related kinase IKKi/IKKvarepsilon gene. *Gene* **353**: 118–133.
106. Bing C (2015) Is interleukin-1 $\beta$  a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte* **4**: 149–152.
107. Clément J-F, Meloche S, Servant MJ (2008) The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell Res* **18**: 889–899.
108. Lo JC, Ljubcic S, Leibiger B, Kern M, Leibiger IB, Moede T, Kelly ME, Chatterjee Bhowmick D, Murano I, Cohen P, et al. (2014) Adipsin is an adipokine that improves  $\beta$  cell function in diabetes. *Cell* **158**: 41–53.
109. Allen NPC, Donninger H, Vos MD, Eckfeld K, Hesson L, Gordon L, Birrer MJ, Latif F, Clark GJ (2007) RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors. *Oncogene* **26**: 6203–6211.
110. Underhill-Day N, Hill V, Latif F (2011) N-terminal RASSF family: RASSF7-RASSF10. *Epigenetics* **6**: 284–292.
111. van der Weyden L, Adams DJ (2007) The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1776**: 58–85.
112. Ikeda M, Kawata A, Nishikawa M, Tateishi Y, Yamaguchi M, Nakagawa K, Hirabayashi S, Bao Y, Hidaka S, Hirata Y, et al. (2009) Hippo pathway-dependent and -independent roles of RASSF6. *Sci Signal* **2**: ra59.
113. Ikeda M, Hirabayashi S, Fujiwara N, Mori H, Kawata A, Iida J, Bao Y, Sato Y, Iida T, Sugimura H, et al. (2007) Ras-association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Exp Cell Res* **313**: 1484–1495.
114. Richter AM, Pfeifer GP, Damman RH (2009) The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 114–128.
115. Zöller M (2011) CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* **11**: 254–267.
116. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, Ghatak S (2011) Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J* **278**: 1429–1443.

117. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, et al. (2011) CD44 Variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc<sup>-</sup> and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* **19**: 387–400.
118. Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K (1995) Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* **82**: 57–65.
119. Sun T, Fu M, Bookout AL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2009) MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* **23**: 925–931.
120. Markowski DN, Helmke BM, Meyer F, von Ahsen I, Nimzyk R, Nolte I, Bullerdiek J (2011) BMP4 increases expression of HMGA2 in mesenchymal stem cells. *Cytokine* **56**: 811–816.
121. Fedele M, Battista S, Manfioletti G, Croce CM, Giancotti V, Fusco A (2001) Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis* **22**: 1583–1591.
122. Kodama K, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, Sirota M, Morgan AA, Chen R, Ohtsu H, et al. (2012) Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 7049–7054.
123. Del Re DP, Matsuda T, Zhai P, Gao S, Clark GJ, Van Der Weyden L, Sadoshima J (2010) Proapoptotic Rassf1A/Mst1 signaling in cardiac fibroblasts is protective against pressure overload in mice. *J Clin Invest* **120**: 3555–3567.
124. Ho TY, Chen YS, Hsiang CY (2007) Noninvasive nuclear factor- $\kappa$ B bioluminescence imaging for the assessment of host–biomaterial interaction in transgenic mice. *Biomaterials* **28**: 4370–4377.
125. Carlsen H, Haugen F, Zadelaar S, Kleemann R, Kooistra T, Drevon C a., Blomhoff R (2009) Diet-induced obesity increases NF- $\kappa$ B signaling in reporter mice. *Genes Nutr* **4**: 215–222.
126. Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Asano T, Li Y, Abiko Y, Nishimura F (2008) DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. *Int J Obes*

- (*Lond*) **32**: 1725–1729.
127. Geurts J, Joosten L a B, Takahashi N, Arntz OJ, Glück A, Bennink MB, van den Berg WB, van de Loo F a J (2009) Computational design and application of endogenous promoters for transcriptionally targeted gene therapy for rheumatoid arthritis. *Mol Ther* **17**: 1877–1887.
  128. Uhlar C, Whitehead A (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute phase reactant. *Eur J Biochem* **265**: 501–523.
  129. Sommer G, Weise S, Kralisch S, Scherer PE, Lössner U, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M (2008) The adipokine SAA3 is induced by interleukin-1beta in mouse adipocytes. *J Cell Biochem* **104**: 2241–2247.
  130. Geurts J, Vermeij E a, Pohlers D, Arntz OJ, Kinne RW, van den Berg WB, van de Loo F a J (2011) A novel Saa3-promoter reporter distinguishes inflammatory subtypes in experimental arthritis and human synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* **70**: 1311–1319.
  131. Ogasawara K, Mashiba S, Wada Y, Sahara M, Uchida K, Aizawa T, Kodama T (2004) A serum amyloid A and LDL complex as a new prognostic marker in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* **174**: 349–356.
  132. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pollin TI, Ryan AS, Nicklas BJ, Snitker S, Horenstein RB, Hull K, Goldberg NH, et al. (2006) Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Med* **3**: e287.
  133. de Oliveira EM, Sandri S, Knebel FH, Contesini CGI, Campa A, Filippin-Monteiro FB (2013) Hypoxia increases serum amyloid A3 (SAA3) in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Inflammation* **36**: 1107–1110.
  134. Rahman SM, Schroeder-Gloeckler JM, Janssen RC, Jiang H, Qadri I, Maclean KN, Friedman JE (2007) CCAAT/enhancing binding protein  $\beta$  deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **45**: 1108–1117.
  135. Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, Fischer SJ, Lowe E, Orlicky DJ, McManaman JL, et al. (2007) CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in Lepr<sup>db/db</sup> mice. *J Biol Chem* **282**: 15717–15729.

136. Huang JH, Liao WS (1994) Induction of the mouse serum amyloid A3 gene by cytokines requires both C/EBP family proteins and a novel constitutive nuclear factor. *Mol Cell Biol* **14**: 4475–4484.
137. Rahman SM, Janssen RC, Choudhury M, Baquero KC, Aikens RM, de la Houssaye BA, Friedman JE (2012) CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice. *J Biol Chem* **287**: 34349–34360.
138. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y (2008) The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* **10**: 1349–1355.
139. Ather JL, Ckless K, Martin R, Foley KL, Suratt BT, Boyson JE, Fitzgerald K a, Flavell R a, Eisenbarth SC, Poynter ME (2011) Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome and promotes Th17 allergic asthma in mice. *J Immunol* **187**: 64–73.



## 謝辞

本研究の遂行、および本論文をとりまとめるにあたり、終始、適切なお指導とご校閲を頂きました広島大学大学院生物圏科学研究科 矢中規之准教授に心より御礼申し上げます。また、博士論文の審査を担当していただき、ご指導ご校閲を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科 加藤範久教授、島本整教授、堀内浩幸教授ならびに島田昌之准教授に深く感謝致します。

また、本実験を進めるにあたり貴重な実験材料である **pMX-puro** を御供与頂いた亀井康富博士（東京医科歯科大、現京都府立大）、**pRRL-Sin cPPT** を御供与頂いた Fons van De loo 博士（Radbond University Nijmegen Medical Center, Netherlands）に厚く御礼申し上げます。また、本研究に対して的確なお指導を賜りました畑裕博士（東京医科歯科大学）、Alexander Sorisky 博士（University of Ottawa, Canada）Philipp scherer 博士（University of Texas Southwestern Medical Center, USA）に深く感謝いたします。

本研究に様々な形でご支援をして頂きました分子栄養学研究室の先輩方、後輩の皆様に厚く御礼を申し上げます。

最後に、どんなときも私を支えてくれた家族に心から感謝致します。

平成 28 年 9 月  
真田 洋平