

## 学位論文の要旨

論文題目 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

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

学生番号 D133521

氏名 眞田 洋平

### [研究背景、および目的]

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、肥満の進行に伴う白色脂肪組織の持続的、かつ軽微な慢性炎症が全身の代謝異常を引き起こす基盤病態である。最近では、肥満脂肪組織内に浸潤する単球・マクロファージ細胞（以下、マクロファージ）と脂肪細胞との相互作用が脂肪組織内の慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性などの代謝異常に寄与する重要な病態シグナルとして報告された。一方で、肥満における脂肪組織のリモデリングが極めて複雑である中で、脂肪細胞とマクロファージの両細胞間の相互作用に基づく病態現象を特異的に解析することは困難であり、肥満脂肪組織における慢性炎症のメカニズムの詳細は不明である。一方、脂肪組織の慢性炎症の予防や軽減を目指した食品機能に関する報告例は増加しているが、その機能性の評価では、解剖時に摘出した組織の炎症性因子の定量解析や組織化学解析に限定され、食品機能を評価する上では不十分である。さらに、機能性試験では、多数の実験動物が使用され、その実施内容などにおいて、動物愛護の面でも社会的問題を含んでいる。しかし近年では、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できる *in vivo* イメージング技術が開発され、低侵襲性の動物実験として利用されつつある。

本研究では、*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基づく遺伝子発現解析を通して、マクロファージの脂肪組織への浸潤によって引き起こされる軽微な慢性炎症や代謝異常の成因となる脂肪細胞由来の因子の単離を試みるとともに、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を選抜し、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病態モデルの構築を目指した。

### [実験方法、および結果]

#### *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

遺伝性肥満 *db/db* マウス、および野生型 *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 マイクロアレイ法により解析し、*db/db* マウスの脂肪組織に

において発現量が有意に増加する 1,810 遺伝子を単離した。一方、抗炎症作用を有するビタミン B6 (B6) を高含量で摂取させたマウスでは、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤が抑制されることを見出したことから、本研究では、B6 を高含量で摂取させたマウスを、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 *in vivo* において特異的に抽出する動物モデルとして利用することを考案した。すなわち、先の 1,810 遺伝子の中から、マクロファージの浸潤が抑制された高 B6 摂取マウスの脂肪組織において発現量が有意に低下している遺伝子群を単離した。その遺伝子群には、マクロファージのマーカー遺伝子やケモカイン類などが多数含まれており、マクロファージの浸潤に関連した遺伝子群が効率的に単離でされていた。さらには、マウスマクロファージ RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) とマウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞との共存培養を行い、*in vivo* において単離したマクロファージの浸潤に関連する遺伝子群の中で、特にマクロファージとの共存培養にตอบสนองして脂肪細胞において発現上昇する候補遺伝子群を選抜した。選抜した因子群の中で、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著しく発現量が増加する炎症性遺伝子として *pentraxin 3 (Ptx3)* を同定した。

#### 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増加する *Ikke* の単離

遺伝子発現解析により、*inhibitor of  $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  (Ikke)* の発現量は *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、正常マウスと比較して有意に高いことを見出した。また肥満マウスおよび正常なマウスの脂肪組織からコラゲナーゼを用いた酵素分散法により単離した成熟脂肪細胞における *Ikke* の発現解析を行った結果、肥満マウスの白色脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞において *Ikke* 遺伝子は高発現していた。さらには肥満脂肪組織におけるマクロファージ数と *Ikke* の発現量には有意な正の相関が認められたことから、*Ikke* は、肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤にตอบสนองして脂肪細胞において発現量が増加することが明らかになった。

#### 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低下する *rassf6* の単離

DNA マイクロアレイ法を用いて、正常なマウスの脂肪組織と比較して *db/db* マウスの脂肪組織において有意に発現量が低下する 1,745 遺伝子を同定し、さらには、B6 摂取によって発現量が増加した 69 遺伝子との重ね合わせにより 18 個の候補遺伝子群を単離した。特に、癌抑制遺伝子である *rassf6* は、*db/db* マウスや食餌誘導性肥満マウスの肥満脂肪組織において有意に発現量が低下する一方で、高 B6 摂取マウスの脂肪組織において有意に発現量が増加した。さらには、活性化 RAW 細胞と共存培養した脂肪細胞においても *rassf6* の発現量は著しく低下した。*rassf6* は、正常なマウスから単離した成熟脂肪細胞において高発現し、さらには、脂肪組織での *rassf6 mRNA* 発現量とマクロファージ数には負の相関が示されたことから、*rassf6* はマクロファージの浸潤量の増加によって脂肪細胞で発現量が低下することが示唆された。*rassf6* に対する siRNA を導入した際の培養成熟脂肪細胞の形質変化を解析した結果、*rassf6* の mRNA 発現の低下によって癌関連遺伝子である *Hmga2* や *CD44* の発現量の増加が明らかになった。

## 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

脂肪組織の慢性炎症を非侵襲的に評価しうる新規動物モデルの確立を目指し、マクロファージ浸潤量のモニターに利用可能な脂肪細胞由来の遺伝子の同定を行った。*in vivo*における肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関連する因子群の中で、マクロファージの浸潤量の増加に応答する脂肪細胞由来の因子であり、さらに *db/db* マウスの脂肪組織において組織選択的に遺伝子発現が誘導する因子の選抜を行い、候補遺伝子として *serum amyloid A3 (saa3)* 遺伝子を単離した。*saa3* 遺伝子の 5'上流領域 (-314/+50) を単離し、*luciferase* 遺伝子と連結した *Saa3-Luc* を構築した。レトロウイルス法を用いて *Saa3-Luc* をマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞に形質転換し、RAW 細胞との共存培養を行った結果、*saa3* 遺伝子のプロモーター活性は、マクロファージの活性化に応答して増加することを確認した。さらに *Saa3-Luc* を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、ゲノム解析を行うことで 10-3 系統を選抜した。10-3 系統を高脂肪食負荷により食餌性肥満を誘導し、D-luciferin を腹腔内投与後、*in vivo* イメージング解析に供した。その結果、高脂肪食を摂取した Tg マウスにおいて脂肪組織に相当する領域に化学発光を認めた。さらには、Tg マウスの主要な組織を摘出し、*in vitro* でのルシフェラーゼ活性を測定した結果、肥満脂肪組織においてルシフェラーゼ活性の有意な上昇を確認した。

### [考察、および展望]

本研究では、DNA マイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析を通じて、*Ptx3* や *Ikke* などマクロファージの脂肪組織への浸潤に反応する脂肪細胞由来の因子の単離が可能となったが、特に、*rassf6* はマクロファージの浸潤によって脂肪細胞での発現が低下する特徴を有している。*rassf6* を含む *rassf* ファミリーは、Hippo 経路の構成分子として細胞死を調節する機能が明らかにされており、癌細胞においてその役割が失われることで細胞死が抑制され、腫瘍の発展に関与する重要な因子として報告されている。事実、脂肪細胞での *rassf6* の発現低下は、癌関連遺伝子の発現を誘導し、脂肪細胞死を制御していることが示唆された。一方、*CD44* は最近、糖尿病の危険因子として報告されるなど、*rassf6* の機能低下が肥満病態の発症に重要な意義を持つ可能性も考えられ、*rassf6* の脂肪細胞における生理的役割の解明が待たれる。

以前、炎症性の転写因子である NF- $\kappa$ B を利用した炎症を可視化するイメージングモデルマウスが開発されているが、全身での高い化学発光を示すなど、脂肪組織の慢性炎症を特異的に評価するイメージングモデルではなかった。本研究で作出した *Saa3-luc* Tg マウスは、食餌誘導性の肥満の発症時に脂肪組織において選択的にルシフェラーゼ由来の化学発光が観察されたことから、脂肪組織の慢性炎症の発症、および病態進行をリアルタイムに解析できる非侵襲モデルとして利用可能である。さらには、dextran sulfate sodium (DSS) による薬剤誘導性大腸炎や関節リウマチにおいて *saa3* が有望な病態マーカーとなりうる可能性が示されており、他炎症性疾患モデルへの応用を目指し、*saa3* の種々の病態組織にお

る発現解析や従来の病態マーカーとの比較解析が必要である。マクロファージの脂肪組織への浸潤量を反映する因子として *saa3* 遺伝子を利用したが、*saa3* 遺伝子のプロモーター領域においては CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (Cebp/ $\beta$ )が重要な役割を担っていることを示唆する研究成果も得られており、マクロファージへ応答した Cebp/ $\beta$  の関与する病態メカニズムの解明につながると期待される。