

「研究テーマ名」 糖尿病発症におけるマクロファージ慢性炎症の意義とその制御

神戸大学大学院医学研究科

楯谷 三四郎

1 研究の背景と目的

糖尿病・肥満状態では脂肪組織や肝臓といったインスリン感受性臓器で免疫細胞の活性を伴う慢性炎症を呈していることが 2003 年以降明らかとなり、炎症の抑制が治療薬開発のターゲットになりうると考えられるようになったが、未だ有望な薬剤は開発されていない。本研究では血管内皮細胞由来の一酸化窒素(NO)シグナルが炎症やインスリン感受性に与える影響を検証し、治療薬開発の対象となりえるのかを明らかとする。世界的に急増する糖尿病を治療するための分子基盤の確立をめざす。

2 研究方法・研究内容

肝臓慢性炎症は Western Blot による I κ B α リン酸化ならびに RT-PCR による IL6 mRNA 発現で評価した。また肝インスリン抵抗性はインスリン依存的 Akt リン酸化 (Ser473) で評価した。コラゲナーゼ処理後の肝臓から磁気ビーズに結合させた F4/80 抗体を使って Kupffer 細胞をマウスから単離し RT-PCR により遺伝子発現を評価した。骨髄移植はマクロファージを初めとする免疫細胞特異的に遺伝子改変マウスを作製する手法として確立されている。970rads の放射線を野生型マウスに照射し、VASP 欠損マウスより単離した骨髄由来マクロファージ (BMDM) を移植することで、骨髄特異的 VASP 欠損マウスを作成する。

3 研究成果

C57BL6 マウスを高脂肪食 (HFD) で飼育すると 8 週後に肝臓慢性炎症と肝インスリン抵抗性が出現したが、それ以前の負荷 4 週後の時点で肝臓の eNOS-p (Ser1177) と一酸化窒素 (NO) 含量が低下していた。RAW マクロファージでは NO 供与体 (DETA-NO) や cGMP アナログ (8Br-cGMP) により LPS 依存的 *TNF α* 、*IL6*、*CD11c* mRNA の増加 (M1 化) が抑制され、同刺激は AML12 肝細胞でもパルミチン酸依存的炎症 (I κ B α -p) と肝インスリン抵抗性発症を抑制した。eNOS 由来 NO の欠損した *eNos*^{-/-}マウスは普通食飼育にも関わらず Kupffer 細胞の M1 化と肝臓慢性炎症、肝インスリン抵抗性が出現したが、C57BL6 マウスに PDE5 阻害剤, sildenafil を投与し cGMP 濃度を増加させると HFD に伴う Kupffer 細胞の M1 化と肝インスリン抵抗性が改善した (図 1)。NO/cGMP の下流分子 Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) を RAW マクロファージ、AML12 肝細胞で各々過剰発現させると NO/cGMP と同様に抗炎症、インスリン抵抗性改善作用がみられ *Vasp*^{-/-}腹腔マクロファージ、*Vasp*^{-/-}初代肝細胞は非刺激下にも関わらず炎症とインスリン抵抗性がそれぞれ誘導されていた。Kupffer 細胞の M1 化と肝インスリン抵抗性は普通食飼育下の *Vasp*^{-/-}マウスならびに骨髄移植にて樹立した骨髄特異的 *Vasp*^{-/-}マウスでも認められた (図 2)。DETA-NO や 8Br-cGMP による抗炎症作用は *Vasp*^{-/-}腹腔マクロファージで消失し、同刺激による抗炎症作用ならびにインスリン抵抗性改善作用は VASP^{-/-}初代肝細胞でも消失しており、この作用が VASP 依存的であることが示唆された。

Vasp 欠損に伴う慢性炎症とインスリン抵抗性の誘導は肝臓のみならず脂肪組織でも認められた。また骨髄特異的 *Vasp* 欠損マウスでは普通食飼育にもかかわらず肝臓、脂肪組織マクロファージは *TNF α* の上昇など慢性炎症の状態を呈し、各々の臓器でインスリン抵抗性 (インスリン依存的 p-Akt の低下) が認められた。IL-4 添加に伴う BMDM の p-STAT6 は *Vasp*

欠損 BMDM では抑制されており、M2 シグナルが抑制される結果、慢性炎症が惹起されるものと考えられる。

Vasp^{-/-}マウスは上記のような表現系が認められたが当初予想しなかった変化が観察された。*Vasp*^{-/-}マウスは通常食においても絶食時肝臓中性脂肪(TG)含量が *WT* マウスに比べ増加し脂肪肝を呈していた。RT-PCR では脂質酸化関連遺伝子 (*Acox1*, *Ppara*, *Cpt1a*, *Ucp2*, *Pgc1a*, *Nrf*, *Tfam*) と VLDL 分泌遺伝子 *Mtp* が *Vasp*^{-/-}マウスで有意に低下しておりこの変化は絶食下でのみ観察された。Triton 刺激による血中 TG 値の増加が *Vasp*^{-/-}マウスで著明に低下していたことから脂肪肝は脂質酸化と VLDL 分泌の低下による可能性が示唆された。AML12 肝細胞に野生型 VASP を過剰発現させると *Mtp* と前述の脂質酸化遺伝子、および[1-¹⁴C] パルミチン酸化(FAO)が増加し、オレイン酸依存的 TG 蓄積が有意に抑制されたが、VASP 欠損肝細胞では FAO が低下したことから肝細胞での直接作用が示唆された。絶食時の肝臓 p-AMPK, p-ACC は *Vasp*^{-/-}マウス肝臓、*Vasp* マウス欠損肝細胞では低下していたが、in vitro VASP 過剰発現により増加した。VASP 過剰発現による前述の変化は AMPK siRNA 存在下では抑制されたが、*Vasp*^{-/-}マウスの脂肪肝は AICAR 投与により回復した。PDE5 阻害剤, sildenafil を *db/db* マウスに投与し VASP 活性を上昇させると AMPK シグナルの回復と共に脂肪肝が改善したが、*Vasp*^{-/-}マウスに対してはこれらの効果が見られなかった。

PKG/VASP シグナルと NASH/NAFLD との関係であるが *Vasp*^{-/-}マウスを HFD で 8 週間飼育すると肝硬変を呈する個体が増加した。cGMP/PKG を活性化させるために PDE5 阻害薬 sildenafil を 8 週間の HFD 期間の最後の 4 週間 *Vasp*^{-/-}マウスに経口投与すると肝硬変の発症は有意に低下した。

AML12 肝細胞に VASP を過剰発現させるとパルミチン酸誘導性の炎症上昇 (*TNF α* , *IL6* mRNA) が抑制された。8Br-cGMP 添加でも同様に p-AMPK, p-ACC の増加とともに、パルミチン酸誘導性の炎症性サイトカインの発現が抑制された。AML12 細胞に VASP を過剰発現させると ATP 濃度が低下した(ctl; 467.5 pmol/10⁶ cells vs VASP; 343.4 pmol/10⁶ cells)が、AMP 濃度は不変であり AMP/ATP 比の上昇の結果、LKB1 経路を活性化させ、AMPK 活性亢進へとつながるものと考えられる。

4 生活や産業への貢献および波及効果

日本の糖尿病人口は2011年で1000万人をこえ、2030年には世界で5億人に達すると IDF は報告している。糖尿病と関連合併症は国民生活を大きく毀損しており医療経済的にも深刻な問題となっている。新規の糖尿病治療につながる分子基盤を確立しその知見を兵庫より発信したいと考えている。

CCL2/CCR2 パスウェイの抑制が糖尿病の治療効果をもつことは既に申請者らによって報告され、この成果をもとに CCR2 拮抗薬が世界各国の製薬会社で開発され現在ファイザー製薬を含む数社でフェーズ II の臨床試験が行われている。申請者らが新規に開発した CCR2 拮抗薬、TEI-K03134 は糖尿病肥満モデルマウスでは効果があったもののサルを対象とした実験では効果が明らかでなかった (未発表データ)。単に CCR2 のみを抑制するのではなく、炎症性シグナルをレベル別に重層的に抑制することが重要であり、そのための分子基盤を解明することが必須であると申請者らは考えている (図3)。NO シグナル、特に cGMP/VASP シグナルの増強がインスリン抵抗性改善効果を有するという申請者らの知見を発展させ、糖尿病治療薬の開発につながる分子基盤の構築に寄与したいと考える。

図 1

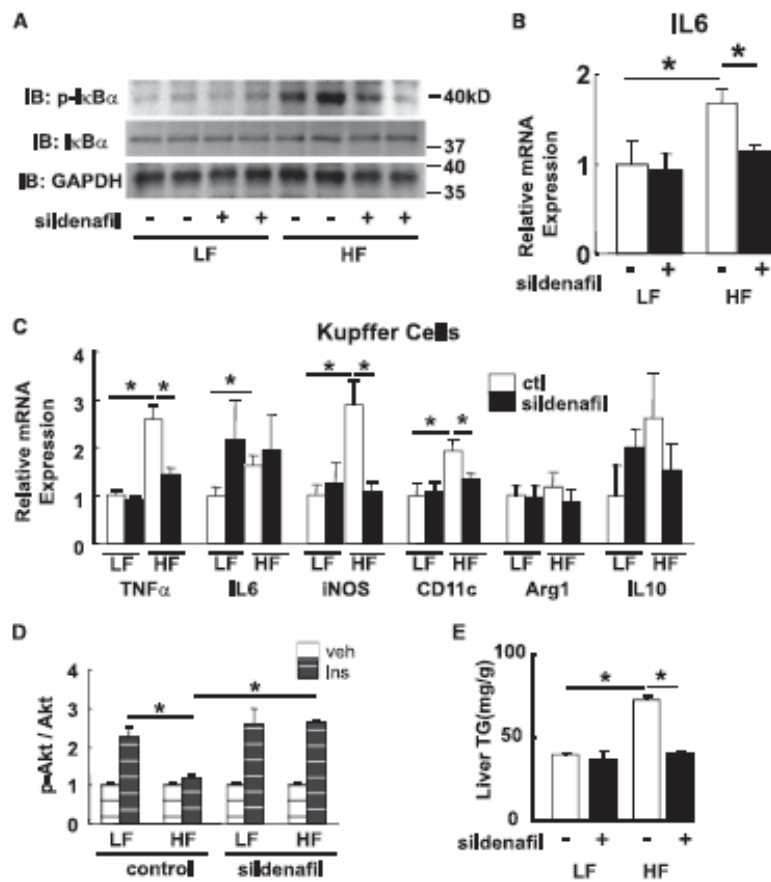


図 2

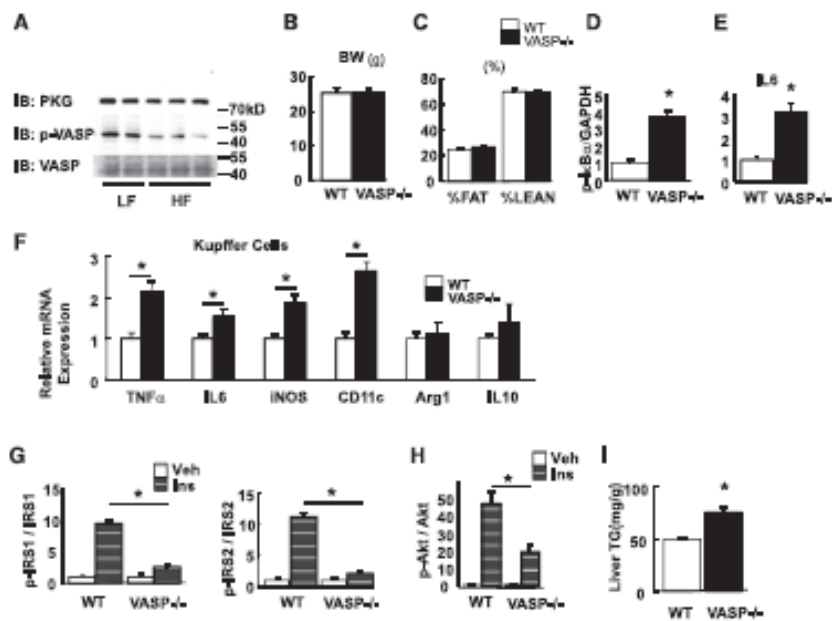


図 3

