

研究報告書

研究課題名：
ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の
分子機構解明

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名: 眞鍋 一郎

(研究期間: 2006年10月1日～2010年3月31日)

研究報告書

1. 研究課題名

ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の分子機構解明

2. 氏名

眞鍋 一郎

3. 研究のねらい

過剰なカロリー摂取や運動不足により肥満が急増しているが、肥満は様々な生活習慣病のリスク要因となることが知られている。特に、内臓肥満を基盤として高血圧、耐糖能異常や脂質代謝異常を併発するメタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患や代謝疾患の重大なリスクとなることが明らかとなっている。脂肪組織は、単に脂肪を蓄積する臓器ではなく、多様な生理活性物質（アディポカイン）を分泌する内分泌臓器であり、メタボリックシンドロームに中心的な役割を果たすと考えられている。我々は、生きている脂肪組織を観察する新しい手法を開発し、肥満脂肪組織にダイナミックな炎症変化が起こっていることを見いだした。脂肪組織の肥満で生じている変化は、動脈硬化形成過程に見られる変化と多くの共通点をもつ慢性炎症と捉えられる。本研究では、生活習慣病の病態メカニズムについて、(1)代謝組織における炎症の意義について解析すること、(2)心血管細胞と代謝細胞の両方でストレス応答を担う転写制御機構について、転写因子 KLF5 に着目した解析を行うこと、(3)心血管系と代謝系の両者に共通して病態を惹起する代謝ストレスの同定とそのシグナル機構の解明を目指して研究を進めた。

4. 研究成果

1 肥満は内臓脂肪組織の炎症を惹起する

脂肪組織はアディポカインと呼ばれる多数の生理活性物質を分泌する。内臓脂肪の肥満は、アディポカインの分泌を変化させ、TNF- α 等の炎症性サイトカインの発現が増加する。このような炎症性サイトカインが、遠隔臓器に炎症を惹起し、動脈硬化やインスリン抵抗性の原因となることが提唱されている。当初、脂肪細胞が炎症性サイトカインを産出すると考えられていたが、肥満した脂肪組織にマクロファージが集積することが明らかとなり、肥満脂肪組織に炎症が生じていることが示唆された。しかし、組織学的に炎症が生じているかど

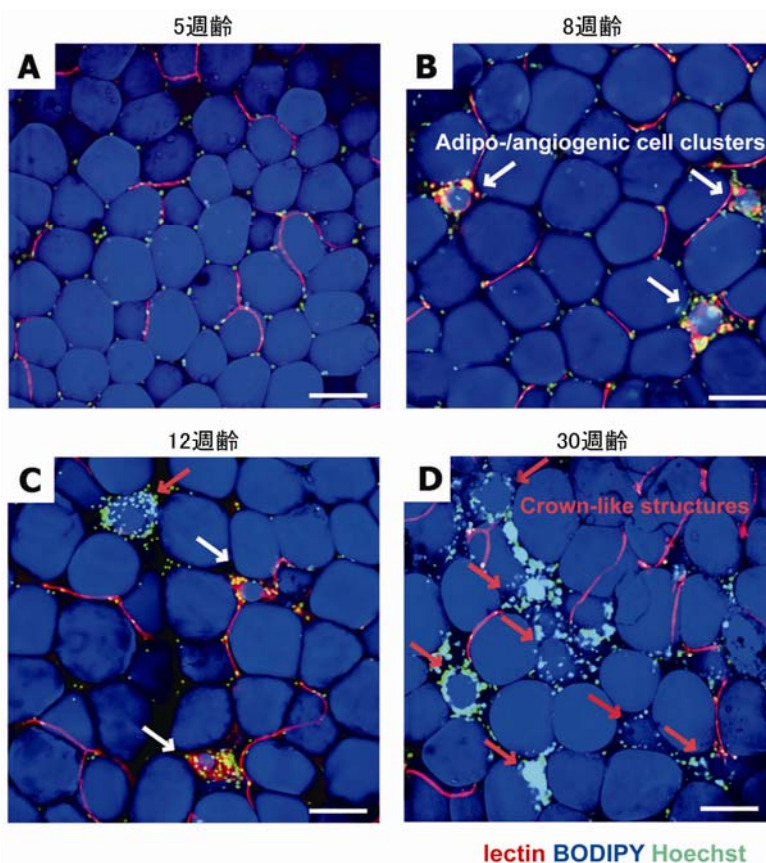


図1 adipo-/angiogenic cell clusters と crown-like structures

db/db マウス精巣上体脂肪組織の肥満過程を観察すると、まず adipo-/angiogenic cell clusters により脂肪細胞新生（組織の hyperplasia）が起こり、これに遅れて肥満が進行すると crown-like structures がみられるようになる。

うかは明確ではなかった。炎症などの多数の細胞が関与して進む複雑な生命現象を解析するためには、その場所で何が起っているかを観察できる手法が必須となる。特に、脂肪組織は脆く、固定・切片作成の際に組織構築を維持することが難しく、また大きな脂肪細胞が主体であることから、従来の観察方法では三次元的なイメージを捉えることが難しい。そこで我々はレーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きている脂肪組織を未固定のまま観察できる新しいイメージング法を開発した。この方法を用いて、内臓脂肪組織を観察したところ、肥満過程においてダイナミックな細胞現象が生じていることが明らかとなった。例えば、

血管新生 (angiogenesis) とリンクした脂肪細胞新生 (adipogenesis) が、我々が adipo-/angiogenic cell clusters と名付けた細胞集団形成によって生じる (図1)。また、肥満の進行によってマクロファージが王冠状に脂肪細胞の周囲に集合する別の種類の細胞集団 (Crown-like structures) が形成され、死んだ脂肪細胞をマクロファージが処理する。肥満慢性期には線維化も認められる (Diabetes 2007)。我々はさらに脂肪組織内血管における細胞・分子現象をリアルタイムで観察する方法を開発した。この方法により、肥満によって血管内皮と白血球の相互作用が亢進することが明

確になった。また、血流の低下も認められ、血管機能の変化が脂肪組織機能異常の原因となっている可能性が示唆された (J Clin Invest 2008)。これらの結果は、肥満した脂肪組織において、明確に慢性炎症と捉えられるダイナミックな変化が生じていることを明らかとした。

このように肥満によって慢性炎症プロセスが惹起されることから、次

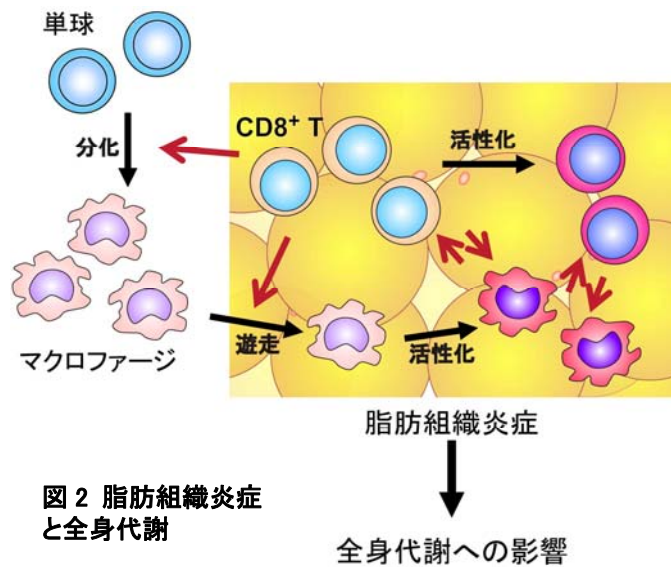


図2 脂肪組織炎症と全身代謝

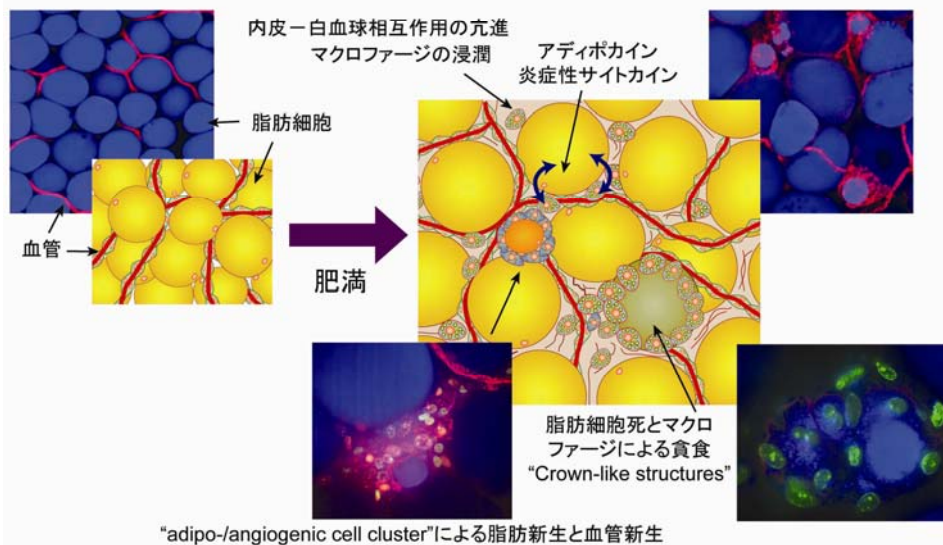
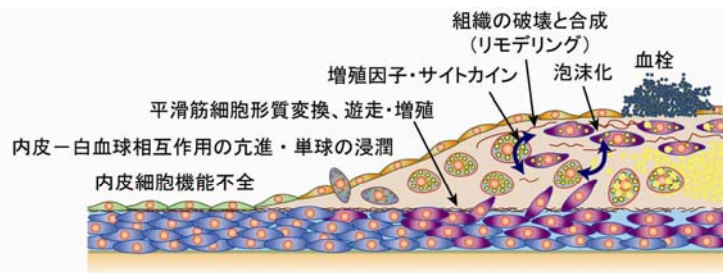


図3 動脈硬化と脂肪組織の肥満

に我々はその誘導メカニズムの解析を行った。高脂肪食負荷による肥満形成過程における精巢上体脂肪組織の stromal-vascular (SV) fraction に存在する細胞種の変化をフローサイトメトリーで解析したところ、M1 マクロファージが増加する以前に effector CD8+ T 細胞が増加することを見いだした。一方、CD4+ T 細胞や制御性 T 細胞は CD8+ T 細胞は減少する。そこで CD8+ T 細胞が脂肪組織炎症に寄与すると考え、複数の方法で CD8+ T 細胞へのインターベンションを行った。抗体による CD8+ T 細胞除去により、脂肪組織へのマクロファージ浸潤は抑制され、炎症性サイトカイン発現も減少した。一方、全身のインスリン感受性は改善した。CD8a ノックアウトマウスでは、高脂肪食により肥満は生じるものの、脂肪組織炎症は著明に抑制されていた。ここに、CD8+ T 細胞を補充すると、脂肪組織炎症が惹起され、インスリン抵抗性も誘導された。これらの結果は、CD8+ T 細胞が肥満脂肪組織における炎症カスケードの誘導に必須であることを示す。さらに、いったん確立した脂肪組織肥満も、CD8+ T 細胞除去により改善することから、脂肪組織炎症の維持にも必須であることが示された。共培養系などの検討により、CD8+ T 細胞、マクロファージ、脂肪細胞の間に密接な相互作用があり、脂肪組織肥満において炎症カスケードを誘発・維持することが示された(図 2)。このように、脂肪組織の肥満においてはダイナミックな炎症プロセスが機能しており、全身の代謝にも多大な影響を与える。

脂肪組織の肥満に認められる現象の多くは、動脈硬化の進展過程で共通して認められる。このことは、代謝組織と血管の病態で多くの共通したメカニズムが機能していることを示唆する(図 3)。

2 心血管疾患と代謝疾患の両者に重要な転写因子 KLF5

我々は転写因子 KLF5 を、血管病態において平滑筋細胞の形質変換を制御する転写因子として同定した(*Nat Med* 2002, *Circ Res* 2005)。KLF5 ヘテロノックアウトマウス(*KLF5*^{+/−})の血管に傷害を与えると、このストレスに対して形成される新生内膜がヘテロノックアウトマウスでは全く認められず、むしろ血管壁は菲薄化する。また、KLF5 は心肥大と線維化にも重要である。興味深いことに KLF5 ヘテロノックアウトマウスは皮下白色脂肪組織(WAT)の発達遅延を示す。この結果は KLF5 が脂肪細胞分化に必要であることを示唆する。我々は KLF5 が脂肪細胞の分化を制御する転写ネットワークの重要な構成因子であることを見いだした(*Cell Metab* 2005)。



図 4 KLF5 の SUMO 化は脂肪酸燃焼関連遺伝子群発現制御の分子スイッチとして機能する

KLF5 が脂肪細胞分化に必須であることから、我々は KLF5 が成体のエネルギー代謝制御にも関わるのではないかと考えた。高脂肪食負荷を与えると、*KLF5*^{+/−}マウスでは摂餌量はむしろ亢進しているにもかかわらず、体重増加は有意に抑制されることが明らかとなった。また、耐糖能やインスリン感受性も維持されており、*KLF5*^{+/−}は高脂肪食によるタボリックシンドロームを呈しにくいことが分かった。KLF5 機能の詳細を解析し、KLF5 が筋細胞内で脂肪酸酸化にかかわる遺伝子群の発現を制御していることを見いだした。定常状態では、KLF5 は small ubiquitin-related modifier (SUMO) が KLF5 のリジン残基に結合する SUMO 化を受けることによって、転写を抑制するコリプレッサーと会合して脂肪酸燃焼に関わる遺伝子群の転写を負に制御している。ここに、PPARδ アゴニストが与えられると、KLF5 の脱 SUMO 化が生じ、SUMO が外れた KLF5 は、今度は転写を活性化するコアクチベーターと会合して、転写を正に制御することが明らかとなった。つまり、KLF5 の SUMO 化は、ちょうど転写の on/off スイッチのような機能を持つ(図 4)。このように、KLF5 は心血管疾患とメタボリックシンドロームの両方で重要な機能を持っている(図 5)。

3 共通した病態惹起因子と慢性炎症を標的とした治療戦略

我々の解析は、代謝臓器の病態にも慢性炎症が重要であることを明確に示した。慢性炎症は、心血管系疾患と代謝疾患の両者で共通した基盤病態であると考えられる。肥満を背景として増加する病態因子として、

我々は遊離脂肪酸に着目し、遊離脂肪酸が血管と代謝系の両者で細胞機能異常を惹起することを見いだした。

慢性炎症が基盤病態として重要なことから、慢性炎症プロセスに介入する新しい治療戦略が考えられるだろう。また一方で、炎症はナノ粒子によるよい治療標的となり得る(*Cancer Res* 2009)。今後さらに、ストレス応答や慢性炎症プロセスによる病態発症メカニズムを解明することによって、新たな治療標的が同定されることが考えられる。

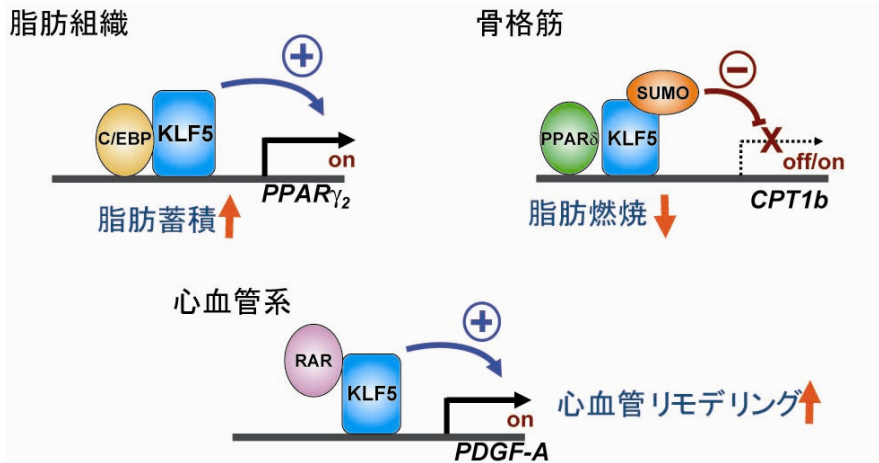


図5 KLF5は心血管系・代謝系の両者で機能して、メタボリックシンドロームと心血管疾患の両方で重要である

5. 今後の展開

広く生活習慣病と癌における慢性炎症の役割を解析することによって、新たな治療標的が同定できると考えられる。

6. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Norihiko Takeda, Koji Maemura, Shuichi Horie §, Katsutaka Oishi, Yasushi Imai, Tomohiro Harada, Tetsuya Saito, Taro Shiga, Eisuke Amiya, Ichiro Manabe, Norio Ishida, Ryozo Nagai, Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, vol. 282, 32561–32567 (2007)
2. Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Yumiko Hosoya, Hiroshi Yamashita, Hideo Fujita, Mitsuru Ohsugi, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki, Ryozo Nagai, Seiryu Sugiura, Adipogenesis in Obesity Requires Close Interplay Between Differentiating Adipocytes, Stromal Cells, and Blood Vessels, *Diabetes*, vol. 56, 1517–1526 (2007)
3. Yo Tanaka, Kae Sato, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Ichiro Manabe, Ryozo Nagai, Takehiko Kitamori, Demonstration of a bio-microactuator powered by vascular smooth muscle cells coupled to polymer micropillars, *Lab Chip*, vol. 8, 58–6 (2008)
4. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S, In vivo imaging revealed local cell dynamics in obese adipose tissue inflammation, *J. Clin. Invest.*, vol. 118, 710–721 (2008)
5. Yumiko Oishi, Ichiro Manabe, Kazuyuki Tobe, Mitsuru Ohsugi, Tetsuya Kubota, Katsuhito Fujiu, Koji Maemura, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Ryozo Nagai, SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR- δ , *Nature Medicine*, vol. 14, 656–666 (2008)
6. Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T,

- Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H, Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, 24682–24689 (2008)
7. Wang G, Watanabe M, Imai Y, Hara K, Manabe I, Maemura K, Horikoshi M, Kohro T, Amiya E, Sugiyama T, Fujita T, Kadowaki T, Yamazaki T, Nagai R, Genetic variations of *mrf-2/arid5b* confer risk of coronary atherosclerosis in the Japanese population, *International Heart Journal*, vol. 49, 313–327 (2008)
 8. Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Nishimura S, Manabe I, Gonda K, Yoshimura KR, Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Nishimura S, Manabe I, Gonda K, Yoshimura KR, *Journal of Cell Science*, vol. 121, 2629–2634 (2008)
 9. Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Koji Eto, Hiroshi Yamashita, Mitsuru Ohsugi, Makoto Otsu, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, Seiryu Sugiura, Kotaro Yoshimura, Takashi Kadowaki, Ryoza Nagai, CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity, *Nature Medicine*, vol. 15, 914–920 (2009)
 10. Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, Nishimura S, Fujiu K, Oishi Y, Itaka K, Kato Y, Yamauchi M, Nagai R, A Nanoparticle System Specifically Designed to Deliver Short Interfering RNA Inhibits Tumor Growth In vivo, *Cancer Res.*, vol. 69, 6531–6538 (2009)
 11. Nishimura S, Manabe I, Nagai R, Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome, *Discov. Med.*, vol. 8, 55–60 (2009)
 12. Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway SJ, Nagai R, Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the heart to pressure overload, *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, 254–265 (2010)

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果

(A) 学会発表

1. 眞鍋一郎、心血管疾患と代謝疾患の接点 転写ネットワークと治療へのトランスレーション、第7回糖尿病・内分泌学リサーチセミナー(東京)(2006年10月19日)
2. 大石由英子、眞鍋一郎、戸辺一之、門脇孝、永井良三、肥満と動脈硬化疾患発症における転写因子 KLF5 の機能解析、第27回日本肥満学会(神戸)(2006年10月27日)
3. 西村智、眞鍋一郎、細谷弓子、長崎実佳、戸辺一之、門脇孝、永井良三、杉浦清了、肥満における脂肪細胞分化・血管新生の可視化、第27回日本肥満学会(神戸)(2006年10月28日)
4. 長崎実佳、眞鍋一郎、西村智、大石由美子、戸邊一之、門脇孝、杉浦清了、永井良三、Lysophosphatidylcholine は脂肪細胞のインスリン抵抗性に寄与する、第27回日本肥満学会(神戸)(2006年10月28日)
5. Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Yumiko Hosoya, Ryoza Nagai, Seiryu Sugiura, Adipogenesis in Obesity is Coupled with Angiogenesis by Circulating Endothelial Progenitor Cells, American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago, USA (2006/11/14)
6. Nobuyuki Yagi, Ichiro Manabe, Hidenoro Takahashi, Jongheon Kim, Katsuhito Fujiu, Yumiko Oishi, Masahiro Yamauchi, Noboru Aoki, Yasuhiro Tamaki, Ryoza Nagai, Systemic siRNA delivery and therapeutic gene knockdown using a novel nanoparticle “Wrapped Liposome”, Nanobio-Tokyo 2006, Tokyo, Japan (2006/12/5)

7. Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Yumiko Hosoya, Ryoza Nagai, Seiry Sugiura, Close interplay between angiogenesis and adipogenesis in obesity revealed by a visualization technique of living adipose tissue, Nanobio-Tokyo 2006, Tokyo, Japan (2006/12/5)
8. Ichiro Manabe, Transcriptional regulation of smooth muscle differentiation, IVth Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, Tokyo, Japan (2006/12/15)
9. Yumiko Oishi, Ichiro Manabe, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki, Ryoza Nagai, KLF5 is important for metabolic stress response, 2007 Keystone symposia, Diabetes/Obesity, Keystone, Colorado, USA (2007/1/16)
10. 眞鍋一郎、循環代謝系組織リモデリングの転写制御、第 10 回循環と細胞機能研究会(東京)(2007年2月10日)
11. Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Yumiko Hosoya, Hiroshi Yamashita, Hideo Fujita, Ryoza Nagai, Seiry Sugiura, Adipogenesis in obesity requires interplay between differentiating adipocytes, stromal cells and blood vessels, 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会(神戸)(2007年3月15日)
12. Mika Nagasaki, Ichiro Manabe, Satoshi Nishimura, Yumiko Oishi, Ryoza Nagai, Lysophosphatidylcholine contributes to insulin resistance in adipocytes, 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会(神戸)(2007年3月17日)
13. Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai, S100A4 is induced by angiotensin II in fibrosis and the target of Beraprost, 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会(神戸)(2007年3月17日)
14. Yumiko Oishi, Ichiro Manabe, Yasushi Imai, Kazuo Hara, Takashi Kadowaki, Ryoza Nagai, Identification of the novel MEF2-Krupple-like factor 5 (KLF5) network that associates with cardiovascular disease, 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会(神戸)(2007年3月17日)
15. Yumiko Oishi, Ichiro Manabe, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki, Ryoza Nagai, KLF5 controls metabolic stress response in metabolic syndrome and cardiovascular disease, 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会(神戸)(2007年3月17日)
16. 眞鍋一郎、メタボリックシンドロームと血管新生・血管機能、第 28 回日本肥満学会(東京)(2007年10月19日)
17. 眞鍋一郎、メタボリックシンドロームと慢性炎症、第 18 回 Hypertension Research Conference(大阪)(2008年7月4日)
18. 眞鍋一郎、脂肪組織の肥満は慢性炎症性疾患である、第 47 回東京脂質代謝研究会(東京)(2008年7月25日)
19. 眞鍋一郎、メタボリックシンドロームと慢性炎症、糖尿病治療フォーラム米子(米子)(2008年9月12日)
20. 眞鍋一郎、メタボリックシンドロームと慢性炎症、第 16 回北海道カルディアックセミナー(札幌)(2008年10月25日)
21. 眞鍋一郎、Adipose tissue obesity is a chronic inflammatory disease、第 25 回 ISHR 日本部会(横浜)(2008年11月26日)
22. 眞鍋一郎、メタボリックシンドロームと心血管病の共通基盤としての慢性炎症、第 8 回 Cutting Edge Forum(大阪)(2008年11月28日)
23. 眞鍋一郎、メタボリックシンドロームと慢性炎症、第 8 回 Metabolic Hypertension Conference(大阪)(2008年12月13日)
24. 眞鍋一郎、肥満脂肪組織の分子イメージングと炎症惹起メカニズム解析、第 14 回アディポサイエンス研究会シンポジウム(大阪)(2009年8月22日)
25. 眞鍋一郎、血管脂肪毒性と炎症、第 17 回日本血管生物医学会(東京)(2009年10月8日)
26. 眞鍋一郎、肥満と血管炎症、第 24 回糖尿病合併症学会(岡山)(2009年10月9日)

27. Ichiro Manabe, Chronic inflammation in cardiovascular and metabolic diseases, Yonsei University Cardiology Conference, Seoul, Korea (2009/10/15)
28. Ichiro Manabe, Chronic inflammation is a common pathologic basis of cardiovascular and metabolic diseases, 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Seoul, Korea (2009/10/16)
29. 眞鍋一郎、心血管・代謝疾患の基盤病態である慢性炎症と遊離脂肪酸、第 82 回日本生化学会大会(神戸)(2009 年 10 月 22 日)
30. 眞鍋一郎、生活習慣病における慢性炎症プロセス、第 32 回日本分子生物学会年会(横浜)(2009 年 12 月 11 日)

(B)受賞

なし

(C)著作物

1. Nagai R, Manabe I, Suzuki T, Krüppel-like Factors: Ingenious Three Fingers Directing Biology and Pathobiology, The Biology of Krüppel-like Factors, Springer-Verlag, pp. 3-18 (2009)
2. Manabe I, Nagai R, Drug development and Krüppel-like factors, The Biology of Krüppel-like Factors, Springer-Verlag, pp. 245-253 (2009)