



# MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue insulin resistance and hepatic steatosis in obesity

楯谷, 三四郎

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3713

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003713>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 4 5 】

|            |                  |
|------------|------------------|
| 氏 名・（本 籍）  | 楯谷 三四郎 （ 兵庫県 ）   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学）           |
| 学 位 記 番 号  | 博い第1767号         |
| 学位授与の 要 件  | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学位授与の 日 付  | 平成18年3月25日       |

【 学位論文題目 】

MCP-1 contributes to macrophage infiltration into  
adipose tissue insulin resistance and hepatic  
steatosis in obesity  
(MCP-1 は肥満においてマクロファージの脂肪組織への遊走  
とインスリン抵抗性、脂肪肝発症に關与する)

審 査 委 員

|     |     |    |    |
|-----|-----|----|----|
| 主 査 | 教 授 | 横山 | 光宏 |
|     | 教 授 | 南  | 康弘 |
|     | 教 授 | 横野 | 浩一 |

Adipocytes secrete bioactive molecules, which are called adipokines.

Adipokines, including TNF $\alpha$ , IL-6, FFA, resistin, adiponectin or leptin affect the insulin sensitivity in liver and skeletal muscle and regulate metabolism in vivo.

We investigated tissue distribution of MCP-1 in genetically obese diabetic db/db mice. MCP-1 expression in WAT and BAT was increased in db/db mice compared to the control mice. Plasma MCP1 concentration was also increased, approximately two-folds elevated in db/db mice compared to the control mice. In high-fat diet induced obese mice, MCP-1 mRNA expression was also increased in WAT and BAT. And plasma concentration was also increased, approximately two folds elevated in HFD-induced obese mice as well. MCP-1 is a potent monocyte chemoattractant factor. And recently, it has been reported macrophages were infiltrated into adipose tissues of obese animals. So, we performed immunohistochemical analysis of epididymal white adipose tissues using Mac-3, anti-macrophage specific antibody. And we confirmed that M $\Phi$ s were actually infiltrated into eWAT in db/db mice and HFD-induced obese mice.

To investigate the primary effects of increased MCP-1 expression in adipose tissue, we generated transgenic mice in which MCP-1 is overexpressed specifically in adipocytes using aP2 promoter. Low grade expression lines of the transgenic mice showed approximately 3-fold increase of plasma MCP1 concentration. This fold increase is similar to that of db/db mice or HFD-induced obese mice compared to the control mice, respectively. So, This Tg mice are appropriate models to investigate the pathological role of increased MCP-1 expression in obese mice. Therefore, we conducted subsequent analyses with this low grade expression (MCP-1 Tg-B) mice compared to WT littermates mice. Fasting plasma glucose and serum FFA were significantly higher in Tg mice than in control mice. M $\Phi$ s were actually infiltrated into adipose tissue in Tg mice by immunohistochemical analysis and quantitative real time-RT-PCR analysis. And the Tg mice showed increased hepatic TG content and manifested both insulin resistance and glucose intolerance in insulin and glucose tolerance tests, respectively.

We next examined MCP-1 homozygous knockout mice to investigate whether the increased MCP-1 in adipose tissue contributes to obesity-induced insulin resistance.

Immunohistochemical analysis using the Mac3 Ab also showed macrophage infiltration into adipose tissue induced by high fat diet was markedly inhibited in MCP-1 knockout mice. Quantitative real time-RT-PCR analysis also supports the consequence.

In metabolic parameters, serum FFA and plasma insulin level were both significantly decreased in MCP-1 knockout mice compared to that in control mice on HFD. Serum adiponectin level was significantly higher in MCP-1 knockout mice.

In KO mice, HFD induced hepatic steatosis was protected, and hepatic TG content was lower than in WT mice. And insulin resistance and glucose intolerance induced by high fat diet were both protected in MCP-1 knockout mice. These results suggest that MCP-1 plays an important role in the pathogenesis of the macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis which were induced by high fat diet.

And then, To examine whether acute loss of MCP-1 function could ameliorate obesity-induced insulin resistance, we inhibited MCP-1 activity by expressing a dominant negative mutant of MCP-1 (7ND) in vivo.

7ND expression reduced hepatic triglyceride content of db/db mice by approximately 50%. Furthermore, 7ND ameliorated insulin resistance in db/db mice compared to the control db/db mice injected with the empty vector. And expression of 7ND also significantly increased both insulin sensitivity and glucose tolerance in high fat diet-induced obese mice in ITT and IPGTT, respectively. These results suggest that even after development of obesity, acute inhibition of increased MCP-1 activity by expressing a dominant negative mutant of MCP1 ameliorated insulin resistance and hepatic steatosis.

These findings suggest that an increase in MCP-1 expression in adipose tissue contributes to the macrophage infiltration into this tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis associated with obesity in mice.

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

|                                  |   |     |        |
|----------------------------------|---|-----|--------|
| 受付番号                             | 甲 第 1768 号  | 氏 名 | 楯谷 三四郎 |
| 論文題目<br>Title of<br>Dissertation | <p>MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity</p> <p>MCP-1は肥満においてマクロファージの脂肪組織への遊走とインスリン抵抗性、脂肪肝発症に関与する</p> |     |        |
| 審査委員<br>Examiner                 | <p>主 査 柳山 孝<br/>Chief Examiner</p> <p>副 査 柳 康博<br/>Vice-examiner</p> <p>副 査 横野 浩一<br/>Vice-examiner</p>   |     |        |
| 審査修了日                            | 平成 18 年 4 月 19 日  |     |        |

（要旨は 1,000 字～2,000 字程度）

脂肪細胞はアディポカインと呼ばれる生理活性物質を分泌し、アディポネクチン、レプチン、TNF- $\alpha$ 、FFA、IL-6、レジスチンなどは肝臓、骨格筋、あるいは中枢などでインスリン感受性に影響を与え、糖代謝を調節していると考えられる。脂肪組織特異的 GLUT4 knock out マウスでは脂肪組織から離れた肝臓や骨格筋でインスリン抵抗性をきたすことが報告されており、脂肪細胞でインスリン依存性の糖取り込みが失われた時、何らかの物質が脂肪細胞から分泌され肝臓や骨格筋でインスリン抵抗性をきたす可能性が示唆される。

脂肪細胞の新しい分泌因子を同定するために 3T3L1 脂肪細胞を用いてマイクロアレイを行った。グルコース除去 medium で培養した時、強く発現が誘導され、かつチアゾリジリン誘導体感受性をもつものとして MCP-1 を同定した。3T3L1 脂肪細胞中の MCP-1 mRNA と培養上清中の MCP-1 濃度がグルコース除去培養下で実際に増加することをそれぞれノザンプロット、ELISA にて確認した。MCP-1 は C-C ケモカインサブファミリーに属し、単球走化性因子として最初同定され、現在は動脈硬化の発症、進展に重要な働きを持っていることが知られている。

MCP-1 の糖尿病、肥満における働きを解明するために、遺伝的肥満糖尿病 (db/db)、高脂肪食(HFD)飼育下肥満マウスでの組織分布を調べたところ MCP-1 の発現は精巣周囲白色脂肪組織、褐色脂肪組織に特異的で、血中 MCP-1 濃度がこれらのマウスでともに約 2 倍の増加を示した。

一方、最近糖尿病、肥満マウスでは脂肪組織にマクロファージが浸潤し軽度の炎症を呈していることが報告されている。実際われわれの検討でも db/db, HFD 飼育下肥満マウスの精巣周囲脂肪組織では成熟マクロファージのマーカー Mac-3 抗体を用いた免疫染色で Mac-3 陽性細胞が増加しており、また flow cytometry においても CD11b, CD45 double positive cell が増加しており、実際にマクロファージ浸潤がこれらのマウスの脂肪組織において増加していると考えられた。脂肪組織の中での MCP-1 の発現を検討してみると db/db, HFD 飼育下肥満マウスでは stromal-vascular 分画(SVF), Adipocyte 分画の両方で増加しており、SVF での増加は浸潤したマクロファージによる可能性が示唆された。以上より糖尿病肥満状態では脂肪細胞の糖利用低下に伴い、MCP-1 分泌が増加し、それが精巣周囲脂肪組織へのマクロファージの浸潤をきたす可能性が示唆される。

脂肪細胞で増加した MCP-1 の直接的な作用を解明するために aP2 プロモーターを用いた脂肪細胞特異的 MCP-1 過剰発現マウス(Tg)を作製した。ノザンプロットでの組織分布で脂肪組織特異的な発現が得られた。血中 MCP-1 濃度は野生型マウスの約 3.9 倍あり、db/db, HFD 飼育下肥満マウスで見られる上昇の程度と近いことから、これらのマウスにおける上昇した血中 MCP-1 濃度の病理学

的な役割を解明するのに適したモデルと考えられる。精巣周囲脂肪組織における Mac-3 抗体を用いた免疫染色、CD11b, CD45 double positive cell の flow cytometry での定量により、マクロファージ浸潤が Tg マウスにて増加していると考えられた。このマウスは血中 FFA、空腹時血糖の増加をきたし、インスリン、グルコース負荷試験においてそれぞれインスリン抵抗性、耐糖能低下を呈していた。高インスリンクランプ試験において肝臓、骨格筋におけるインスリン抵抗性が存在すると考えられた。また Tg マウスは脂肪肝をきたしており、以上から脂肪細胞からの MCP-1 が糖尿病肥満モデルマウスで上昇する程度に過剰に分泌されると、脂肪組織にマクロファージが浸潤し、インスリン抵抗性、脂肪肝を示すことがわかった。

次に MCP-1 homozygous knockout(KO)マウスを用いて検討した。白色脂肪組織の免疫染色、flow cytometry での検討で MCP-1 KO マウスは高脂肪食で誘導されるマクロファージ浸潤が抑制されることが示された。メタボリックパラメーターでは血清 FFA、インスリン値が KO マウスは低く、血清アディポネクチン値は逆に高い結果となった。KO マウスは HFD で誘導される脂肪肝がコントロールマウスと比べ軽く、インスリン、グルコース負荷試験においてそれぞれインスリン感受性、耐糖能改善を認めた。高インスリンクランプ試験で KO マウスは肝臓でのインスリン感受性がコントロールマウスと比べ亢進していた。これらの結果は HFD で誘導される脂肪組織へのマクロファージ浸潤、インスリン抵抗性、脂肪肝発症に MCP-1 は重要な役割を担っていることを示唆している。

更に MCP-1 の活性を急激に抑制した時、HFD で誘導されるインスリン抵抗性が改善されるかを検討するために、in vivo で MCP-1 のドミナントネガティブミュータントである 7ND を発現させて MCP-1 の活性を抑制し実験を行った。7ND は db/db マウスの肝 TG 含量を約 50%減少させ、インスリン、グルコース負荷試験においてそれぞれインスリン感受性、耐糖能を改善させた。高インスリンクランプ試験で肝臓でのインスリン抵抗性が 7ND 発現群で改善していることが明らかとなった。これらの結果は糖尿病、肥満を呈した後でも上昇した MCP-1 の活性を落とせばインスリン抵抗性、脂肪肝が改善されることを示唆している。

本研究は糖尿病肥満における脂肪組織での MCP-1 の発現の役割について研究したものであるが、従来殆ど行われなかった MCP-1 の発現増加が脂肪組織へのマクロファージの浸潤とインスリン抵抗性、脂肪肝発症に関与するということが示され、糖尿病治療薬の新たなターゲットとして期待されるという重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。