



Modulation of lipid mediator profile may contribute to amelioration of chronic inflammation in adipose tissue of obese mice by pioglitazone

Okada, Kumiko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-12-19

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3360号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003360>

※ 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。



学位論文の内容要旨

Modulation of lipid mediator profile may contribute to amelioration of chronic inflammation in adipose tissue of obese mice by pioglitazone

ピオグリタゾンによる脂質メディエータープロファイルの変化は肥満マウスの脂肪組織における慢性炎症の改善に関与する

(指導教員: 神戸大学大学院医学研究科医科学専攻小川涉教授)

岡田久美子

【背景・目的】

肥満において、内臓脂肪では軽度の慢性炎症が生じており、この炎症が、肥満によって惹起されるインスリン抵抗性と2型糖尿病をはじめとする関連疾患の発症と進展に重要な役割を果たしていると考えられている。

ピオグリタゾンをはじめとするチアゾリジン薬はインスリン抵抗性改善系薬に分類される代表的な2型糖尿病治療薬である。本薬剤は、核内受容体PPAR γ を活性化することにより肥大化した脂肪細胞のアポトーシスを誘導し、正常な小型の脂肪細胞の分化増殖を誘導し脂肪組織の機能を正常化すると考えられている。チアゾリジン薬は、抗炎症性アディポカインであるアディポネクチンの発現を誘導することや炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-6の発現を抑制することが示されており、そのインスリン抵抗性改善作用の一部に脂肪組織の慢性炎症改善効果が関与するものと推定されている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムについては不明である。

プロスタグランジン類をはじめとする脂質メディエーターには炎症性と炎症収束性のものがあり、局所における免疫反応を調節している。脂質メディエーターと代謝疾患との関連については、これまでに、炎症性の脂質メディエーターであるロイコトリエンB₄(LTB₄)が脂肪組織の慢性炎症とこれに伴うインスリン抵抗性の病態に関与すること、炎症収束性の脂質メディエーターであるリポキシンA₄(LXA₄)の投与により肥満マウスの脂肪炎症と肥満に関連した肝障害や腎障害が緩和されることが示されている。しかしながら、チアゾリジン薬が脂質メディエータープロファイルにどのような影響を及ぼすかについては知られていない。本研究では、肥満・糖尿病モデルマウスであるKKAYマウスにピオグリタゾンを投与し、脂肪細胞における脂質メディエータープロファイルの変化を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

まず、7週齢の雄性KKAYマウスを馴化後、対照群とピオグリタゾン投与群に群分けし、ピオグリタゾン投与群には0.01%ピオグリタゾン混餌食を給餌した。1週目に、血中パラメーターの評価を行い、ピオグリタゾンの効果を確認した。ピオグリタゾン投与群において血糖値および血中インスリン値が有意に低下しておりインスリン抵抗性と糖代謝の改善が認められた。また、中性脂肪値、遊離脂肪酸値も有意に低下し脂質代謝の改善も認められた。総コレステロール値に変化はなかった。4週間投与後に解剖を行い、精巣周囲脂肪組織を採取し、炎症性・抗炎症性遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により解析した。炎症性サイトカイン、ケモカイン遺伝子である*Ccl2*, *Il6*, *Tnf*の発現に変化はなかったが、抗炎症性遺伝子である*Il10*, *Arg1*の有意な増加が認められた。また、同じく抗炎症性遺伝子である*Il10*も増加傾向が認められた。以上より、ピオグリタゾンはKKAYマウスの脂肪組織において、抗炎症作用を有することが確認された。

ピオグリタゾンが内臓脂肪の脂質メディエータープロファイルに及ぼす影響を明らかにするために、採取した精巣周囲脂肪組織片を脂質メディエーターの測定に供した。脂質メ

ディエーターは、質量分析センターの篠原正和准教授との共同研究により、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を用いて測定した。この方法は、70種類以上の脂質メディエーターを包括的かつ好感度に測定することができるシステムである。その結果、抗炎症性のリポキシン B₄ (LXB₄)、レゾルビン E₂ (RvE₂)、エイコサペンタエン酸 (EPA) が有意に増加し、プロstagランジン E₂ (PGE₂) と 4-ヒドロキシドコサヘキサエン酸 (4-HDHA) が有意に減少していた。

脂肪組織は脂肪細胞のほかに、血球細胞や血管内皮細胞など様々な細胞で構成されている。我々は、脂肪細胞に対するピオグリタゾンの効果を明らかにするために、3T3-L1 脂肪細胞をピオグリタゾンで処理し、産生される脂質メディエーターを評価した。その結果、LXB₄ および EPA の有意な増加が認められた。この変化は、KKAY マウスの精巣周囲脂肪組織で認められたピオグリタゾンの効果と一致することから、精巣周囲脂肪組織における LXB₄ と EPA の増加は脂肪細胞に由来するものと考えられた。ピオグリタゾン投与により PGE₂ と 4-HDHA の増加が認められたが、KKAY マウスの精巣周囲脂肪組織におけるピオグリタゾン投与効果とは一致しなかった。また、RvE₂ については 3T3-L1 細胞において検出できなかったことから、脂肪細胞における産生量は多くない可能性が考えられた。LXB₄ の生理作用はほとんど知られていないことから、以降、LXB₄ に着目することにした。

我々は、ピオグリタゾンによる LXB₄ 産生誘導の分子メカニズムを明らかにするために、ピオグリタゾン投与した KKAY マウスの脂肪組織を用いてマイクロアレイ解析を行った。5-リポキシゲナーゼ (5-LOX)、12-リポキシゲナーゼ、15-リポキシゲナーゼ、5-リポキシゲナーゼ活性化タンパクなどが LXB₄ 産生に関与するが、これらの遺伝子発現に変化は認められなかった。

LXB₄ の生理作用として、LTB₄ 依存的な多核白血球マイグレーションの阻害及びその活性化調節、並びに非炎症性単球のマイグレーションの活性化などが知られているが、肥満脂肪組織の慢性炎症に及ぼす効果については知られていない。LXB₄ の生理作用を明らかにするために、単離した精巣周囲脂肪組織片を LXB₄ で処理し、抗炎症性遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、IL10 発現の有意な増加が認められた。

【考察】

以上の結果から、肥満糖尿病モデルマウスである KKAY マウスへのピオグリタゾン投与により、精巣周囲脂肪組織における脂質メディエータープロファイルを変化させることができた。脂肪組織は、脂肪細胞に加えてさまざまな細胞で構成されているが、ピオグリタゾンは 3T3-L1 脂肪細胞において LXB₄ の産生増加させたことから、この薬剤は脂肪細胞に直接作用して LXB₄ の産生を増加させるものと考えられた。本研究で評価した LXB₄ 産生に関わる遺伝子の発現に変化はなかったが、タンパクレベルでの発現調節や、リン酸化等の修飾による活性化調節が関与する可能性は否定できない。また、生成過程を触媒する未同定の分子の発現が変化している可能性も想定される。故に、今後のさらなる解析が必要である。

今回我々は、肥満マウスの脂肪組織において LXB₄ が抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現を増加させることにより抗炎症性を発揮する可能性を見出した。IL-10 は肥満マウスの脂肪組織で発現が減少していることが報告されているが、ピオグリタゾンによる脂肪組織慢性炎症の改善作用に LXB₄ を介する IL-10 の発現誘導が関与する可能性がある。

LXB₄ の構造異性体である LXA₄ は高脂肪食摂取マウスの精巣周囲脂肪組織において M2 マクロファージを増加させることが報告されている。チアゾリジン薬であるロシグリタゾンはラット脳卒中モデルにおいて 5-LOX の発現増加を介して LXA₄ の産生を増加させることができ報告されている。本研究においては、ピオグリタゾンにより精巣周囲脂肪組織において 5-LOX の発現や LXA₄ の濃度に変化は見られなかったことから、チアゾリジンによる 5-LOX-LXA₄ の制御は組織依存的であると考えられる。LXA₄ のレセプターはすでに同定されているが LXB₄ のレセプターは未同定である。LXB₄ レセプターの同定は、LXB₄ の生理作用を理解する上で非常に重要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2169 号	氏名	岡田 久美子
論文題目 Title of Dissertation	<p>Modulation of lipid mediator profile may contribute to amelioration of chronic inflammation in adipose tissue of obese mice by pioglitazone ピオグリタゾンによる脂質メディエータープロファイルの変化は肥満マウスの脂肪組織における慢性炎症の改善に関与する。</p>		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	西慎一	
	副査 Vice-examiner	石田達郎	
	副査 Vice-examiner	田守義和	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

背景・目的: ピオグリタゾンはじめとするチアゾリジン薬は、核内受容体PPAR γ を活性化することにより脂肪細胞のアポトーシスを誘導し、正常な小型の脂肪細胞の分化増殖を誘導し脂肪組織の機能を正常化すると考えられている。チアゾリジン薬は、抗炎症性アディポカインであるアディポネクチンの発現を誘導することや炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-6の発現を抑制しインスリン抵抗性改善作用を示すがその詳細な分子メカニズムについては不明である。

脂質メディエーターには炎症性と炎症収束性メディエーターがあり、局所における免疫反応を調節している。これまでに、炎症性の脂質メディエーターであるロイコトリエンB₄(LTB₄)が脂肪組織の慢性炎症と共に伴うインスリン抵抗性の病態に関与すること、炎症収束性の脂質メディエーターであるリポキシンA₄(LXA₄)の投与により肥満マウスの脂肪炎症と肥満に関連した肝障害や腎障害が緩和されることが示されている。チアゾリジン薬が脂質メディエータープロファイルにどのような影響を及ぼすかについては今まであまり知られていない。本研究ではこの点を評価することを目的とした。

方法: 肥満・糖尿病モデルマウスである KKAY マウスにピオグリタゾンを投与し、脂肪細胞における脂質メディエータープロファイルの変化を検討した。対象組織としては、精巣周囲脂肪組織を用いた。炎症性マーカー、脂質メディエータープロファイルの解析に関しては、PCR 法、液体クロマトグラフィー- tandem デンタル質量分析装置 (LC-MS/MS) による解析を用いた。7 週齢の雄性 KKAY マウスを馴化後、対照群とピオグリタゾン投与群に群分けし、ピオグリタゾン投与群には 0.01% ピオグリタゾン混餌食を給餌した。4 週間投与後に評価した。

結果: 1 週目に血中パラメーターの評価を行いピオグリタゾンの効果を確認した。ピオグリタゾン投与群において血糖値および血中インスリン値が有意に低下しておりインスリン抵抗性と糖代謝の改善が認められた。その後 4 週目の評価では、炎症性サイトカイン、ケモカイン遺伝子である *Ccl2*, *Il6*, *Tnf* の発現に変化はなかったが、抗炎症性遺伝子である *Il10*, *Arg1* の有意な増加が認められた。また、同じく抗炎症性遺伝子である *Il10* も増加傾向が認められた。脂質メディエータープロファイルにおいては、抗炎症性のリポキシン B₄ (LXB₄)、レゾルビン E2 (RvE2)、エイコサペンタエン酸 (EPA) が有意に増加し、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) と 4-ヒドロキシドコサヘキサエン酸 (4-HDHA) が有意に減少していた。ピオグリタゾンによる LXB₄ 産生誘導の分子メカニズムを明らかにするために、ピオグリタゾンを投与した KKAY マウスの脂肪組織を用いてマイクロアレイ解析を行った。5-リポキシゲナーゼ (5-LOX)、12-リポキシゲナーゼ、15-リポキシゲナーゼ、5-リポキシゲナーゼ活性化タンパクなどが LXB₄ 産生に関与するが、これらの遺伝子発現に変化は認められなかった。LXB₄ の生理作用を明らかにするために、単離した精巣周囲脂肪組織片を LXB₄ で処理し、抗炎症性遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、*Il10* 発現の有意な増加が認められた。

考察: ピオグリタゾンは KKAY マウスの脂肪組織において、抗炎症作用を有することが確認された。また、抗炎症性脂質メディエーターが増加していることも確認された。これらの結果の中でも、肥満マウスの脂肪組織において LXB₄ が抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現を増加させることにより抗炎症性を発揮する可能性を見出した。

本研究はピオグリタゾンが LXB₄ の発現増強を惹起し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現を誘導することを解明した価値ある業績である。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める