

## 論文要旨等報告書

氏	山下明子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3733 号
学位授与の日付	平成 20 年 9 月 30 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Macrophage-adipocyte interaction: Marked IL-6 production by co-cultures stimulated with LPS(マクロファージと脂肪細胞の相互作用:LPS刺激はマクロファージ-脂肪細胞共培養系からのIL-6産生を強力に促進する)
論文審査委員	教授 北山 滋雄 教授 高柴 正悟 准教授 苔口 進

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

2 型糖尿病やメタボリックシンドロームの発症・進行には、内臓脂肪組織から産生される一連の生理活性物質（アディポサイトカイン）の分泌異常が深く関わっている。近年、脂肪組織からのアディポサイトカイン産生に、マクロファージが関与することが報告された（Kathryn E *et al.*, *J Clin Invest*, 2003）。すなわち、脂肪細胞周囲に末梢から遊走・浸潤したマクロファージから産生される種々のサイトカインが脂肪細胞に働くことで相互に作用しあい、脂肪組織からのアディポサイトカイン産生異常を惹起し、2 型糖尿病やメタボリックシンドロームの発症・進展をさらに促進するという、脂肪細胞-マクロファージ相互作用説である。しかるにマクロファージが集積・浸潤している脂肪組織では、炎症関連遺伝子の発現が亢進しているとの報告はあるものの、その詳細な分子間相互作用は未だ解明されていない。さらに脂肪細胞・マクロファージともに toll-like receptor-4 (TLR-4) を発現し、遊離脂肪酸がそのリガンドとして作用することで、一層のアディポサイトカインの産生亢進が起こる可能性が示唆された。歯周病原性細菌などのグラム陰性菌に由来する内毒素（lipopolysaccharide: LPS）は TLR-4 の外因性リガンドとして知られる。近年、歯周病に代表される局所の軽微な感染が肝臓由来 C-反応性タンパク（CRP）の産生を亢進させることから、何らかの機序で全身的な炎症が惹起され、この炎症反応がインスリン抵抗性や動脈硬化病変の進行に影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで局所の軽微な感染が増幅される機序を脂肪細胞-マクロファージ相互作用説に求め、LPS が本相互作用をさらに増幅するとの仮説を設け、マクロファージと脂肪細胞の共培養系に LPS を作用させた際の、アディポサイトカイン産生性を調べるとともに、産生に影響がみられた場合、その機序を考察することとした。

#### 【材料および方法】

1. 供試細胞およびその培養：マウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞とマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 細胞を用いた。脂肪細胞は、Bernlohr らの方法 (*Proc Natl Acad Sci USA*, 1984) に従って、3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させて実験に供した。孔径が 0.4  $\mu\text{m}$

である多孔性メンブレンによって培養ウェルの上室と下室を分離して、液性因子のみが各室間を移動できるようにした6ウェルトランスウェルシステム (Corning) を用いて、その下室で分化した3T3-L1 ( $1 \times 10^5$  cells/well) を、上室でRAW264.7 ( $5 \times 10^4$  cells/well) を培養した。

2. LPS 刺激と培養上清中のサイトカインの測定：両細胞を 1~100 ng/ml の *E.coli* LPS (O55:B5 : Sigma) で 24 時間刺激後、培養上清を回収した。代表的なアディポサイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), さらに adiponectin に関して、LPS 刺激後に上清中の蛋白レベルを測定し、単独培養および LPS 無刺激の場合と比較した。測定には市販の ELISA キットを用いた。炎症性サイトカイン産生の上流に位置する TNF- $\alpha$  の役割をみる為、抗 TNF- $\alpha$  中和抗体を用いた阻害実験を行った。また、IL-6 産生に関して LPS と TNF- $\alpha$  の相乗効果を確認することを目的に、LPS 刺激下の分化脂肪細胞にリコンビナント マウス TNF- $\alpha$  (1ng/ml; R & D System) を添加し、IL-6 産生性への影響を調べた。上清中の IL-6 は先述と同様に ELISA キットで測定した。
3. 統計：各種濃度の LPS 刺激によって産生される各サイトカイン量の違いは、Student-*t* test によって検定した。

## 【結果】

1. LPS 刺激によるマクロファージおよび脂肪細胞からのサイトカイン産生性：TNF- $\alpha$  の産生は、マクロファージあるいは脂肪細胞単独での培養系においては、主にマクロファージから産生され、脂肪細胞からはほとんど産生されなかった。TNF- $\alpha$  の産生性は共培養の有無にかかわらず、有意な差はなかった。IL-6 は、単独培養系において、LPS 刺激下の脂肪細胞でのみ産生が観察された。そして、その産生量は共培養によって 100 倍以上に増加した。MCP-1 は、主に脂肪細胞から産生され、共培養によって産生性が 5 倍程度増加した。adiponectin は、単独培養・共培養の違いあるいは LPS の有無による有意な差は無かった。
2. LPS 刺激下脂肪細胞 - マクロファージ共培養系において抗 TNF- $\alpha$  中和抗体が IL-6 産生に及ぼす影響：抗 TNF- $\alpha$  中和抗体は、濃度依存的に IL-6 の産生を抑制した。
3. リコンビナントマウス TNF- $\alpha$  が脂肪細胞からの IL-6 産生に及ぼす影響：外因性 TNF- $\alpha$  は、脂肪細胞からの IL-6 の産生性を亢進した。その産生量は、LPS 刺激下での脂肪細胞 - マクロファージ共培養系における産生量の約 30% 程度であった。

## 【考察および結論】

歯周炎に代表されるサブクリニカルな軽微な感染が増幅される機序として、細菌 LPS 等の感染抗原にさらされた活性化マクロファージに由来する微量の TNF- $\alpha$  や他の液性因子が脂肪細胞を活性化し、脂肪細胞からの IL-6 や MCP-1 の産生を強力に促進することが判明した。このように、歯周病のような軽微であっても持続する感染と過剰に産生された IL-6 は CRP 値の上昇やインスリン抵抗性に関与し、一方 MCP-1 は脂肪組織へのさらなるマクロファージの浸潤を促進し、炎症反応をさらに助長する可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

2 型糖尿病などのメタボリックシンドロームの発症・進行には、内臓脂肪組織から産生される生理活性物質（アディポサイトカイン）の分泌異常が深く関わっている。近年、脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生に、マクロファージが関与することが報告された（Kathryn E. Wellen et al., J Clin Invest, 2003）。すなわち、脂肪細胞周囲に末梢から遊走・浸潤したマクロファージから産生されるサイトカインが、脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生異常を惹起し、2 型糖尿病やメタボリックシンドロームの発症・進展をさらに促進するという、脂肪細胞 - マクロファージ相互作用説である。しかるにマクロファージが集積・浸潤している脂肪組織では、炎症関連遺伝子の発現が亢進しているとの報告はあるものの、その詳細な分子間相互作用は未だ解明されていない。

近年、歯周炎に代表される局所の軽微な感染が肝臓由来 C-反応性タンパク（CRP）の産生を亢進させることから、何らかの機序で全身的な炎症が惹起され、この炎症反応がインスリン抵抗性や動脈硬化病変の進行に影響を及ぼす可能性が示唆されている。

本研究は、局所の軽微な慢性炎症である歯周炎がメタボリックシンドロームの病態形成を促進する機序を脂肪細胞-マクロファージ相互作用説に求め、LPS が本相互作用をさらに増幅するとの仮説を設け、その機序を解明しようとするものである。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

- 1) マウス脂肪細胞とマウスマクロファージの共培養下で、歯周病細菌感染を想定した低濃度 LPS 刺激により、IL-6 や MCP-1 の産生性が強力に亢進した。
- 2) 抗 TNF- $\alpha$  中和抗体は、共培養系を LPS 刺激することにより、相乗的に亢進した IL-6 の産生性を濃度依存性に抑制した。
- 3) リコンビナント TNF- $\alpha$  と LPS は脂肪細胞からの IL-6 の産生性を亢進した。その産生量は、LPS 刺激下での脂肪細胞 - マクロファージ共培養系における産生量の 30% 程度であった。

これらの結果は、歯周炎に代表される局所の軽微な慢性炎症がメタボリックシンドロームの病態形成を促進する機序として、LPS に代表される感染抗原に晒された活性化マクロファージ由来微量 TNF- $\alpha$  や他の液性因子が脂肪細胞を活性化し、脂肪細胞からの IL-6 や MCP-1 などのサイトカインの産生を強力に促進することを示唆するものである。

よって、審査委員は本論文に博士（歯学）の学位論文として価値を認める。