

主論文

Spred2 Regulates High Fat Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation, and Metabolic Abnormalities in Mice

(Spred2 は高脂肪食負荷マウスにおける内臓脂肪織炎、代謝異常を制御する)

【緒言】

メタボリック症候群の基盤病態として内臓脂肪型肥満とインスリン抵抗性が知られている。肥満の脂肪組織では、脂肪細胞の肥大化、マクロファージの浸潤に加え、サイトカイン・ケモカインを介する両者の相互作用が関与した慢性炎症が生じている。ERK/MAPK 経路は、脂肪細胞とマクロファージのいずれにおいても重要であり、ERK/MAPK 経路が脂肪織炎に関与していることが報告されている。Sprouty-related EVH1-domain-containing protein (Spred2)は、Ras/Raf/ERK/MAPK 経路の抑制因子である。そこで、Spred2 が食餌性肥満と肥満関連の代謝異常に関与していると仮説を立て、Spred2 knock out (KO)マウスと wild type (WT)マウスに高脂肪食を負荷し、Spred2 のメタボリック症候群発症における役割を検討した。

【材料と方法】

食餌性肥満モデルマウス

C57BL/6J マウス(WT)と、Spred2 KO マウスに、離乳後 4 週齢より通常食(359kcal/100g; 脂肪含有量 12.8%)と高脂肪食(506kcal/100g; 同 60.0%)を摂取させた。12 週齢もしくは 20 週齢時に安楽死させ、全血、腸間膜脂肪組織(mWAT, mesenteric white adipose tissue)、肝臓を採取した。血清生化学検査に加え、組織はホルマリンで固定し、パラフィン包埋標本を作製した。mWAT の一部は、II 型コラゲナーゼで分解し、遠心して脂肪細胞分画と間質血管系分画(SVF, stromal vascular fraction)に分離した。

グルコース負荷試験とインスリン負荷試験

20 週齢まで高脂肪食を摂取させた WT もしくは Spred2 KO マウスに対し、グルコース(1g/kg)もしくはインスリン(1U/kg)を腹腔内投与し、一定時間毎に尾静脈より採血を行って、血中グルコース濃度を測定した。

骨髄由来マクロファージの培養

WT もしくは Spred2 KO マウスの大腿骨・脛骨から骨髄細胞を回収し、M-CSF 存在下で 7 日間培養して、骨髄由来マクロファージ (BMDMs: bone marrow-derived macrophages) に分化誘導した。BMDMs をパルミチン酸 (PA, palmitic acid) で刺激した。また、U0126 で前処置を行った後に PA 刺激を行った。さらに、WT マウス由来 BMDMs に Spred2 発現ベクターをトランスフェクションし、Spred2 を過剰発現させて同様の実験を行った。

脂肪細胞の分化誘導と Spred2 のノックダウン

3T3-L1 前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞へ分化誘導した後、siRNA を用いて Spred2 RNA をノックダウンし、TNF α で刺激した。

脂肪分解アッセイと脂肪酸取り込みアッセイ

WT もしくは Spred2 KO マウスの精巢上体周囲脂肪組織を II 型コラゲナーゼで分解して初代脂肪細胞を回収した。TNF α 存在下に培養した後に、培養液中のグリセロール濃度を測定した。また、脂肪細胞をインスリン存在下に BODIPY FL C16 (蛍光色素と結合した脂肪酸)と共に培養し、細胞溶解液の蛍光強度(Em 503nm, Ex 512nm)を測定した。

免疫染色

mWAT のパラフィン包埋標本を用いて、抗 F4/80 抗体、抗 iNOS 抗体、抗 CD206 抗体を使用して免疫染色を行った。

RT-qPCR

mWAT、肝臓、脂肪細胞分画、SVF から RNA を抽出し、cDNA 化した後、Taqman プローブを用いて RT-qPCR を行った。内因性コントロールには *rplp0* を用いた。

ウエスタンブロッティング

BMDMs の溶解液を用いて SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写した後、抗 p-ERK 抗体、抗 t-ERK 抗体を用いてウエスタンブロッティングした。

ELISA

培養溶液に含まれる TNF α 、MCP-1 の濃度を、sandwich ELISA を行って測定した。

[結果]

Spred2 KO マウスでは食餌性肥満が増悪し、脂肪細胞の肥大化と脂質異常症を生じる

20 週齢まで高脂肪食を摂取させたところ、Spred2 KO マウスでは、WT マウスに比して顕著な体重増加を認め、mWAT もより重くなった。高脂肪食負荷 Spred2 KO マウスでは、脂肪細胞が有意に大きくなり、肥大化した。20 週齢における血清コレステロール値、血清トリグリセリド値は Spred2 KO マウスで有意に高値であった。

Spred2 KO マウスでは脂肪織炎が増悪する

高脂肪食負荷 Spred2 KO マウスの mWAT にはより多くの F4/80 陽性マクロファージが浸潤しており、crown-like structure もより多く認めた。さらに、Spred2 KO マウスには、より多くの iNOS 陽性 M1 マクロファージが浸潤していた。

Spred2 KO マウスでは高脂肪食負荷時にインスリン抵抗性が増悪し、高度の脂肪肝疾患を生じる

20 週齢まで高脂肪食を摂取させたマウスにグルコース負荷試験を行ったところ、負荷 45 分後、60 分後の血糖値は Spred2 KO マウスで有意に高値であった。また、インスリン負荷試験では、負荷 60 分後の血糖低下率が Spred2 KO マウスで有意に低く、インスリン抵抗性が増悪していた。また、高脂肪食負荷 Spred2 KO マウスは有意に肝重量が重く、より高度の肝細胞の脂肪変性、炎症細胞浸潤を認めた。

Spred2 KO マウスでは特に SVF においてサイトカイン産生が増加する

高脂肪食を摂取させたマウスの mWAT から RNA を抽出し、PCR を行ったところ、TNF α 、MCP-1 ともに Spred2 KO マウスで増加する傾向を認めた。mWAT を脂肪細胞分画と SVF に分離して解析したところ、SVF において、Spred2 KO マウスで TNF α は 2.2 倍、MCP-1 は 3.1 倍の発現量増加が見られた。脂肪細胞分画におけるアディポカインの発現量を両群間で比較したが、有意差は認めなかった。

脂肪細胞におけるサイトカイン産生と脂質代謝は、Spred2 欠損に影響されない

3T3-L1 細胞より分化誘導した成熟脂肪細胞に siRNA を用いて Spred2 のノックダウンを行い、TNF α で刺激したところ、Spred2 のノックダウンを行っても、TNF α 、MCP-1 の mRNA 発現量はコントロールと同等であった。また、WT マウスもしくは Spred2 KO マウスから採取した初代脂肪細胞において、グリセロール産生量、脂肪酸取り込み量を測定したが、両群間で有意差は認めなかった。

マクロファージにおけるサイトカイン産生には ERK/MAPK 経路が関与している

BMDMs を誘導し、PA で刺激したところ、Spred2 KO マウス由来の BMDMs では TNF α と MCP-1 の産生量が有意に増加した。さらに U0126 で前処置を行うと、Spred2 KO 由来、WT 由来いずれも同等にサイトカイン産生量が減少した。さらに、PA 刺激 2 時間後、4 時間後において、Spred2 KO マウス由来 BMDMs で ERK のリン酸化が有意に高度であった。

Spred2 過剰発現は、マクロファージにおけるサイトカイン産生を抑制する

WT マウス由来 BMDMs に Spred2 を過剰発現させ、PA で刺激を行ったところ、TNF α の産生量は変わらなかったが、MCP-1 産生量は有意に減少した。

【考察】

今回我々は、**Spred2** が食餌性肥満と肥満関連の代謝異常に関与していることを明らかにした。**Spred2 KO** マウスの **mWAT** では、特に **SVF** 分画において **TNF α** 、**MCP-1** の発現が増加しており、また **Spred2 KO** マウス由来の **BMDMs** では、**PA** の存在下でより多くの **TNF α** 、**MCP-1** を産生することを見出した。一方で、**WT** および **Spred2 KO** マウス由来の初代脂肪細胞は、脂肪分解能や脂肪酸取り込み能に有意差を認めなかった。このことから、**Spred2 KO** マウスにおける脂肪織炎の増悪は、特にマクロファージにおいて、**Spred2** の欠損に伴いサイトカイン産生能が亢進していることが一因であると考えた。**Spred2** 欠損状態では、マクロファージ活性の増加、脂肪織炎とインスリン抵抗性の増悪を介することで、食餌性肥満、メタボリック症候群の病態が形成されていると考えた。

【結論】

Spred2 は、特にマクロファージにおける **ERK/MAPK** 経路を抑制し、高脂肪食負荷による脂肪織炎、インスリン抵抗性の増悪を抑制的に制御することで、食餌性肥満、メタボリック症候群の発症を抑制している。