

# 代謝シグナルによる炎症の慢性化機構の解明と医学応用

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科

臓器代謝ネットワーク講座

菅波 孝祥

## 1. はじめに

脂肪組織は、余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積するエネルギー貯蔵器官として、また、多くのアディポサイトカインを分泌する内分泌器官として多彩な生命現象に関与する。近年、肥満の脂肪組織がダイナミックな形態的变化（組織リモデリング）を伴う慢性炎症性変化をきたし（脂肪組織炎症）、アディポサイトカインの産生調節異常やインスリン標的臓器の異所性脂肪蓄積（脂肪毒性）を介して、全身のインスリン抵抗性や臓器機能不全に至ることが明らかになってきた。即ち、メタボリックシンドロームにおいて、脂肪組織を起点とする複雑な臓器代謝ネットワークの破綻により全身臓器に慢性炎症が波及すると想定されるが、その全貌や炎症波及の分子機構は未解明である。

一方、個々の細胞における炎症の慢性化機構も未だ不明の点が多い。脂肪毒性の分子基盤として、飽和脂肪酸により誘導される慢性炎症が注目されているが、脂肪毒性の分子機構には組織（細胞）特異性が存在し、脂肪酸の作用は複数の受容体や種々の中間代謝産物を介するなど一様ではない。申請者らを含む複数のグループは、飽和脂肪酸により誘導される炎症性サイトカイン産生において4型Toll様受容体（TLR4）の重要性を報告している<sup>1,2)</sup>。一方、飽和脂肪酸は、小胞体ストレス応答を活性化し、炎症促進的に働くことも知られている<sup>3,4)</sup>。そこで、本研究では、飽和脂肪酸により誘導される細胞内炎症の慢性化機構の解明を目的とした。

## 2. 方法および結果

### ①飽和脂肪酸によるATF4経路の活性化：

TLR4欠損マウスと野生型マウスから腹腔内マクロファージを調整し、代表的な飽和脂肪酸であるパルミチン酸により誘導される遺伝子を、DNAマイクロアレイ法（Affymetrix社、GeneChip Mouse Genome 430 2.0）により網羅的に解析した。野生型マクロファージとTLR4欠損マクロファージの両者において誘導される122遺伝子についてクラスター解析を施行したところ、転写因子NF- $\kappa$ BとPERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4（activating transcription factor 4）経路の活性化が示唆された。実際、TLR4欠損マクロファージにおいても、パルミチン酸はeIF2 $\alpha$ のリン酸化、ATF4蛋白レベルを増加し、CHOPやTrib3などのATF4標的遺伝子の発現を誘導した。これに対して、魚油に多く含まれるn-3多価不飽和脂肪酸は、パルチミン酸によるATF4経路の活性化を強力に抑制した。

### ②炎症性サイトカイン産生におけるATF4の意義：

そこで、パルミチン酸により誘導される炎症性サイトカイン産生におけるATF4の意義を検討した。ATF4ヘテロ欠損マクロファージでは、パルミチン酸によるinterleukin-6（IL-6）、IL-12

などの誘導が顕著に抑制されたが、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の誘導には差を認めなかった。PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4経路は小胞体ストレス応答経路の1つであるため、小胞体ストレス誘導剤 (thapsigarginやtunicamycin) の投与を行ったところ、同様の結果が得られた。これらの実験系において、培養上清中のIL-6蛋白量もATF4依存性に増加することを確認した。さらに、小胞体ストレス誘導剤を腹腔内投与して、肝臓、脾臓、脂肪組織を検討したところ、ATF4ヘテロ欠損マウスではIL-6 mRNAの有意な抑制が認められた。即ち、飽和脂肪酸を代表とする様々な代謝ストレスによりPERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4経路が活性化され、IL-6が誘導されると想定される。

### ③ATF4による炎症性サイトカイン誘導の分子機構：

IL-6プロモーター上には、NF- $\kappa$ B結合配列の近傍にATF4結合配列 (cyclic AMP response element: CRE) が存在し、種を超えて保存されている。そこで、ATF4によるIL-6発現制御のメカニズムとして、まず、NF- $\kappa$ Bの活性化におけるATF4の意義を検討した。Western blottingにより、ATF4ヘテロ欠損マクロファージでは、パルミチン酸によるNF- $\kappa$ Bの核移行が著明に阻害されることを見出した。この時、レポーターアッセイにより、IL-6プロモーターの転写活性も低下することを確認した。このATF4によるNF- $\kappa$ B核移行の制御機構は未だ不明であるが、NF- $\kappa$ Bの主要な制御分子であるI $\kappa$ B $\alpha$ は、ATF4ヘテロ欠損マクロファージにおいても野生型マクロファージと同様の動態を示し、ATF4はI $\kappa$ B $\alpha$ とは独立したメカニズムによりNF- $\kappa$ Bの活性化を制御すると推測される。

次に、IL-6プロモーターに対するATF4の直接作用を検討した。まず、クロマチン免疫沈降法により、パルミチン酸の刺激下においてIL-6プロモーターにATF4がリクルートされることを明らかにした。また、ATF4の過剰発現によりIL-6プロモーターの活性化が認められ、ATF4結合配列に変異を加えることにより阻害された。以上より、ATF4は、IL-6プロモーターに対する直接作用とNF- $\kappa$ Bの活性化を介する作用の両方によりIL-6発現を誘導することが明らかになった。

### ④ATF4によるTLR4経路の活性化：

次に、ATF4経路を活性化させた場合、炎症反応に影響を及ぼすかどうかを検討した。即ち、様々な手法を用いてATF4を活性化すると、TLR4経路を介する炎症性サイトカイン産生が顕著に増強することが明らかになった。例えば、ATF4を選択的に活性化するsalubrinal (eIF2 $\alpha$ 脱リン酸化抑制剤) を投与すると、リポポリサッカライド刺激によるIL-6産生が顕著に増加した。興味深いことに、この系においても、TNF- $\alpha$ 産生に変化は認められなかった。

## 4. 考察

本研究により、飽和脂肪酸により誘導される炎症反応において、ATF4を介する新たな細胞内経路の関与が明らかになった。従来より、飽和脂肪酸による炎症惹起作用は脂肪毒性の機序の1つとして知られているが、脂肪酸は細胞内に取り込まれて様々な代謝を受けるのみならず、GPCRやTLRなどの細胞膜受容体やPPARなどの核内受容体に直接作用するなど多様な作用を示すため、詳細な分子機構は未だ不明であった。本研究において我々は、既に報告しているTLR4経路に加えて、ATF4経路が飽和脂肪酸による炎症性サイトカイン産生に重要な役割を果たすことを明らかにした。一方、ATF4経路は、酸化ストレスに対して保護的に働くなど炎症抑制性に働く可能

性も報告されている<sup>5)</sup>。おそらく、ATF4は、細胞種や細胞の状態に応じて炎症を制御するものを推測される。本研究では、代謝シグナルによるATF4経路の活性化が、TLR4シグナルを増強することを見出した。即ち、細胞のストレス状態が炎症反応を修飾する可能性が示唆される。ATF4は全身に広く分布するため、マクロファージにおけるATF4の機能的意義を明らかにするためには、今後、組織特異的KOマウスを用いた検討などが必要と思われる。一方、n-3多価不飽和脂肪酸は、ATF4経路の活性化を強力に抑制した。n-3多価不飽和脂肪酸による抗炎症作用はよく知られているが、その分子機構は十分に分かっていない。細胞ストレス応答における飽和脂肪酸とn-3多価不飽和脂肪酸の拮抗作用の分子機構の解明が待たれる。さらに、本研究の成果は、機能的食品の開発や健康的な食生活の指針の提言に繋がると期待される。

## 5. 発表論文

### ■発表論文

Iwasaki Y, Suganami T (co-corresponding author), Hachiya R, Shirakawa I, Kim-Saijo M, Tanaka M, Hamaguchi M, Takai-Igarashi T, Nakai M, Miyamoto Y, Ogawa Y. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. **Diabetes** 2013 Aug 29. [Epub ahead of print]

### ■参考文献

1. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27: 84-91, 2007.
2. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.** 116: 3015-3025, 2006.
3. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. **Cell** 140: 338-348, 2010.
4. Furuhashi M, Tuncman G, Görgün CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. **Nature** 447: 959-965, 2007.
5. Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsuhashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchitti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. **Circ. Res.** 105: 1118-1127, 2009.