

氏 名 まはむど あるしやど
MAHMOOD ARSHAD

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲 148 号

学位授与年月日 平成 26 年 9 月 26 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程
生命・臨床医学

学位論文題目 **Myeloid-Specific deletion of Hypoxia-inducible factor 1-alpha
gene protected against Diet induced Insulin resistance**
(骨髄特異的な Hypoxia-inducible factor 1-alpha 遺伝子の欠失は
食餌由来ノインスリン抵抗性に対して保護作用を有する)

論文審査委員

(主査)	教授	齋藤	滋
(副査)	教授	服部	裕一
(副査)	教授	近藤	隆
(副査)	教授	杉山	敏郎
(指導教員)	教授	戸邊	一之

論文内容の要旨

Abstract

Aims/hypothesis : High-fat diet obesity causes the adipose tissue to expand at a much higher pace than the ability of vasculature to match the demand of rapid growing tissue, thus ensuing the hypoxia and induction of HIF-1 α gene, which in turn causes the induction of inflammatory state through M1 macrophages and is strongly correlated with the systemic insulin resistance. Aim of this study is to investigate the effect of myeloid-specific deletion of HIF-1 alpha gene in diet-induced obesity and systemic insulin resistance in mice model. **Methods**: Myeloid-specific HIF-1 α knockout mice (Mye-HIF-1 α KO) were employed with the challenge of high-fat diet (HFD) for 18 weeks. Intra peritoneal glucose tolerance test (IP-GTT) and intra peritoneal insulin tolerance test (IP-ITT) were performed after 17 weeks of HFD. **Results**: WAT, liver and skeletal muscle were examined for inflammation, hypoxia, ER-stress, oxidative stress, angiogenesis and finally for insulin sensitivity through gene expression analysis, immunohistochemistry, microsphere analysis and western blotting. Results: Mye-HIF-1 α KO mice revealed reduced adiposity, much rich vasculature with low hypoxic and inflammatory profile, improved glucose tolerance with markedly reduced gluconeogenic genes expression in liver and enhanced energy expenditure in skeletal muscle. **Conclusion**: Myeloid-specific deletion of HIF-1 alpha gene has a beneficial role against obesity-associated inflammation, thus contributing to the improvement of the whole body resistance.

学位論文審査の要旨

【背景と目的】過食・高脂肪食・運動不足の生活習慣により 2 型糖尿病患者が増加しており、その病態の解明と治療法の開発は急務である。その原因は、肥満に伴うインスリン抵抗性の増悪である。インスリン抵抗性の原因として、内臓脂肪の蓄積が注目されてきたが、内臓脂肪における慢性炎症が重要と考えられている。肥満者の内臓脂肪組織には、炎症性サイトカインを高発現する M1 マクロファージ (M ϕ) が増加しているがその原因については必ずしも明らかではない。肥満者の脂肪組織は、急激な脂肪組織の増大に対して血管新生が追い付かず低酸素になっている。この低酸素が、内臓脂肪組織における炎症、すなわち、M1M ϕ の増加、全身的なインスリン抵抗性に関与することが示唆されてきた。そこで Mahmood 君は本研究において、HIF-1 α を骨髄細胞系列特異的に欠損したマウスを作製し、マクロファージの低酸素シグナル (HIF-1 α) が脂肪組織の炎症および全身の代謝に与える変化について検討した。なお、HIF-1 α は、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor:低酸素誘導因子)-1 を形成するヘテロダイマーの構成因子の一つで、低酸素によりその蛋白レベルでの分解が抑制されて、低酸素状態に適応するために必要な遺伝子群 (血管新生に関する増殖因子 VEGFA や解糖系の代謝の酵素) の転写を調節する。

【方法】HIF-1 α 遺伝子の両側に loxP 配列を持つマウスと、lysozyme M プロモータにより Cre リコンビナーゼが発現するマウス (いずれも C57BL/6J マウス) を交配することにより、マクロファージ特異的 HIF-1 α 欠損マウス (以下 KO) を作製した。KO およびコントロールマウス (以下 WT) を生後 6 週より 18 週間、高脂肪食 (総カロリーの 60% が脂質に由来する) にて飼育し、肥満インスリン抵抗性モデルを作成した。その後、糖代謝を、IP-GTT (intraperitoneal glucose tolerance test) ならびに IP-ITT (intraperitoneal insulin tolerance test) で評価、および脂肪組織の炎症、低酸素関連遺伝子と血管新生を mRNA 発現、免疫組織検査ならびに Western blotting で解析を行った。

【結果】

まず、KO において、骨髄細胞系列特異的に HIF-1 α 遺伝子が欠損していること、脂肪組織において HIF-1 α の下流である VEGF、Glut-1、IL-1 β など低酸素関連遺伝子の発現が低下していることを確認した。①代謝の評価: 摂餌量と体重は KO と WT で差を認めなかった。精巣上体脂肪の重量は KO で有意に減少していた (約 20%)。WT に比べ KO では糖負荷試験およびインスリン負荷試験にて評価した耐糖能とインスリン感受性が改善しており、精巣上体脂肪、肝臓、骨格筋におけるインスリンシグナルが増強していた。②精巣上体脂肪の評価: 精巣上体

脂肪組織において、脂肪細胞のサイズは KO と WT で変化がなかったが、KO では M1M ϕ よりなる crown-like structures (CLS) (肥大脂肪細胞が necrosis を起こし低酸素領域になっている) の数が有意に減少していた。また、KO では CD11c や M1 M ϕ から産生される炎症性サイトカインである TNF α 、MCP-1、IL-6、IL-1 β などの mRNA 発現が低下していた。また、アディポネクチン、PPAR γ 、PGC-1 α などの良好な脂肪細胞の代謝を反映する遺伝子群の発現が KO 脂肪組織で上昇していた。③精巣上体脂肪の血管新生の評価：次に、KO におけるインスリン感受性が良好である原因について脂肪組織の低酸素の状況について検討した。KO の精巣上体脂肪では、低酸素プローブであるピモニダゾールの取り込みが低下していた。興味深いことに KO の脂肪組織では VEGF の低下にも関わらず、血管のマーカー CD31、VE-cadherin は増加していた。さらに、血管内皮のマーカーである CD31 抗体を使った組織染色や、Yellow Dye Microsphere を使った検討において、KO の精巣上体脂肪では血管密度が高かった。すなわち、脂肪細胞を栄養する血管が十分に発達していることが、M1M ϕ が集積する CLS が少なく、脂肪細胞の代謝状態が良好に保たれる原因と考えられた。また、KO マウスの脂肪組織より採取した前駆脂肪細胞において、angiopoietin-1 や FGF-2、FGF-10 などの VEGF 以外の血管新生因子の発現が上昇し、KO での血管密度が高い原因と考えられた。また、肥満状態での脂肪組織では、マクロファージ HIF-1 α を介して発現される炎症性サイトカインが前駆脂肪細胞での血管新生因子群の発現を抑制していることが示唆された。④肝臓と骨格筋の評価：KO の肝臓では PEPCK、G6Pase など糖新生に関連する遺伝子発現が低下していた。また、KO の骨格筋では、ミトコンドリア代謝に係る遺伝子の発現が増加していた。

【総括】 Mahmood 君は、骨髄細胞系列特異的に HIF-1 α を欠損するマウスを作製し、高脂肪食負荷したところ、肥満マウスの脂肪組織に認められるマクロファージは、HIF-1 α 依存性に炎症反応の活性化を促進し、また肥満脂肪組織の血管新生に抑制的に働くことで低酸素化を引き起こし、全身性のインスリン抵抗性の発症に関与することを見出した。

以上のことから、脂肪組織中のマクロファージが HIF-1 α を介し、高脂肪食負荷時の脂肪組織中の種々の炎症性サイトカイン産生を高めるばかりでなく、血管新生を阻害し、低酸素化を引き起こし、その結果、全身性のインスリン抵抗性をきたすことが、モデル動物を用いて初めて明らかにした。これらの点については、これまでに報告がなく本報が初めての報告となり、学術的新規性があり、また高脂肪食による肥満症に対するインスリン抵抗性に対する新たな治療法の開発にも繋がり、臨床的発展性が期待される。

以上より、本審議会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。