



表 1. Chemokines and receptor expressing cells

| Motif | Chemokine             | Receptor-expressing cells                |
|-------|-----------------------|--|
| CC    | MCP-1                 | monocyte, T cell, basophil               |
|       | RANTES                | eosinophil, basophil, monocyte, Th1 cell |
| CXC   | ENA-78                | neutrophil                               |
|       | IL-8                  | neutrophil, CD8+ T cell, NK cell         |
| C     | Lymphotactin- $\beta$ | lymphocyte                               |
| CX3C  | Fractalkine           | T cell, monocyte, NK cell                |

組織は、もはや中性脂肪を蓄積する臓器ではなく、内分泌臓器として位置づけられるようになった。高脂肪食摂取により内臓脂肪組織へ好中球の一過性遊走・浸潤が起こる<sup>4)</sup>。また、肥満マウスモデルを用いた内臓脂肪組織の免疫組織染色では、マクロファージと同様に CD4<sup>+</sup>T 細胞が遊走・浸潤することが報告<sup>5)</sup>された。更に、T 細胞から分泌される免疫調節サイトカインである interferon (IFN) - $\gamma$  により免疫反応が増強される<sup>5)</sup>。また、脂肪組織の炎症では、Natural killer T 細胞も重要な役割を演じていることが報告されている<sup>6)</sup>。

ケモカインは、細胞表面上の G 蛋白質共役受容体を介して白血球の遊走と活性化に関わっているサイトカインである。システイン配列の違いにより、ケモカインは CC, CXC, XC, CX3C の4種類に分類される。それぞれのケモカインは特定の白血球の遊走・浸潤に関与している (表 1)。本研究では、内臓脂肪細胞における慢性炎症反応機序を解明する目的で、ヒト凍結内臓前駆脂肪細胞より分化・誘導

した成熟脂肪細胞を用いて、BMI の上昇に伴う内臓脂肪組織のケモカイン発現の相違について検討した。

## II. 方 法

### 1. ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞

脂肪細胞は単一ドナー由来のヒト凍結内臓脂肪前駆細胞 (DS Pharm Biomedical, Suita, Japan) を使用した。また、ドナーはすべて米国 FDA 認可のプログラムに従って管理されており、インフォームド・コンセント取得後に採取された大網脂肪組織より visceral preadipocyte が分離された (Zen-Bio, Inc, Research Triangle Park, NC)。使用したヒト凍結内臓前駆脂肪細胞のドナー情報を表 2 に示す。WHO では 25 以上を太り過ぎ (overweight), 30 以上を肥満 (obese) と定義されており、本研究で使用したドナーを、 $>30 \text{ kg/m}^2$  BMI 群と  $<30 \text{ kg/m}^2$  BMI 群に分けた。また、解凍後の細胞は、生存率、形態観察、分化能を確認して使用した。

表 2. Donor information

| Age | BMI  | Gender | Race | Smoker |
|-----|------|--------|------|--------|
| 28  | 26.6 | F      | AA   | N      |
| 28  | 47.8 | M      | AA   | N      |

AA; African American, N; Non-smoker

表 3. 培養用培地

|                                  |
|----------------------------------|
| DMEM/Ham's F-12 medium (1:1,v/v) |
| HEPES pH7.4                      |
| Fetal bovine serum               |
| Penicillin                       |
| Streptomycin                     |
| Amphotericin B                   |

### 2. ヒト凍結内臓脂肪前駆細胞の分化・誘導

凍結内臓脂肪前駆細胞は培養用培地 (図 3) を用いて融解した。 $1 \times 10^6$  cells/vial を融解し、細胞密度を  $4 \times 10^4$  cells/ml に調整した。細胞浮遊液を 15ml 遠心管に移し、更に培地 10ml を添加後 1,500rpm, 1 分間遠心し細胞を洗浄した。上清を取り除き同培地に浮遊させ 6 well plate に 1 well あたり  $2.5 \times 10^4$  cells を播種した。37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。2 日に 1 度、培地交換を行いコンフルエントになるまで 4~7 日培養した。分化培地 (表 4) を用いて分化誘導後に、内臓脂肪細胞培養用培地 (表 5) に交換した。

表4. 分化培地

|                                  |
|----------------------------------|
| DMEM/Ham's F-12 medium (1:1,v/v) |
| HEPES pH7.4                      |
| Fetal bovine serum               |
| PPAR $\gamma$ -agonist           |
| Biotin                           |
| Isobutylmethylxanthine           |
| Pantothenate                     |
| Penicill                         |
| Human insulin                    |
| Streptomycin                     |
| Dexamethasone                    |
| Amphotericin B                   |

表5. 培養用培地

|                                  |
|----------------------------------|
| DMEM/Ham's F-12 medium (1:1,v/v) |
| HEPES pH7.4                      |
| Fetal bovine serum               |
| Dexamethasone                    |
| Biotin                           |
| Amphotericin B                   |
| Pantothenate                     |
| Penicillin                       |
| Human insulin                    |
| Streptomycin                     |

3.RNA の抽出及び RT-PCR 法

培養上清を取り除き, ISOGEN RNA kit 1ml を加え脂肪細胞を溶解させた。クロロホルムを0.2ml 加え, 12,000g, 15min, 4℃にて遠心を行った。遠心後, 水層部分を別のエッペンチューブに移し, イソプロパノール 0.5ml を加え12,000g, 10min, 4℃で遠心を行った。RNA 沈殿以外を取り除き, 70% エタノール 1ml を加え混和後, 7,500g, 5min, 4℃にて遠心を行った。70% エタノールを取り除き, 乾燥後 pH8.0 TE Buffer 80  $\mu$ l にて溶解した。RNA の OD 比 (260/280) が1.8以上になることを確認した。0.5  $\mu$ g の RNA を PrimeScript™ Reverse Transcriptase (タカラバイオ) で逆転写を行った。逆転写後, c DNA 生成物 5  $\mu$ L を目的の遺伝子を増幅する primer 5 nM, TaKaRa Ex Taq HS を用いて PCR を行った。PCR 産物の解析はアガロース電気泳動を用いた。アガロースゲルの濃度は2%とし, 100V で約40分電気泳動を行った。電気泳動後はエチジウム・プロミド溶液で染色を行い, バンドを観察した。Forward primer 及び Reverse primer の情報は表6に記載した。

Ⅲ. 結 果

BMI (>30 kg/m<sup>2</sup>) 由来の内臓脂肪細胞では, RT-PCR 法にて CCL2(MCP-1), CCL5 (RANTES),

表6. PCR 用 forward (sense) and reverse (antisense) primer 配列

| Primer                | Sequence   |
|-----------------------|--|
| $\beta$ -actin        | Sense:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'<br>Antisense:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'  |
| MCP-1                 | Sense:5'-CAAACCTGAAGCTCGCACTC-3'<br>Antisense:5'-CATTTCCACAATAATATTTTAG-3'     |
| RANTES                | Sense:5'-CTACTCGGGAGGCTAAGGCAGGAA-3'<br>Antisense:5'-GAGGGGTTGAGACGGCGGAAGC-3' |
| ENA-78                | Sense:5'-ATCTCCGCTCCTCCACCCAGT-3'<br>Antisense:5'-TTCTTGTCTTCCCTGGGTTTCAGA-3'  |
| IL-8                  | Sense:5'-GCTTTCTGATGGAAGAGAGC-3'<br>Antisense:5'-GGCACAGTGAACAAGGACT-3'        |
| Lymphotactin- $\beta$ | Sense:5'-AGGAGAATGCTCCGTCTGAA-3'<br>Antisense:5'-CAGCTGTATTGGTCGATTGC-3'       |
| fractalkine           | Sense:5'-AGGAGAATGCTCCGTCTGAA-3'<br>Antisense:5'-AGAAGAGGAGGCCAAGGAAG-3'       |

CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), XCL2 (Lymphotactin  $\beta$ ), CX3CL1 (Fractalkine) mRNA の発現が認められた (図 1)。一方, BMI (<30 kg/m<sup>2</sup>) 由来の内臓脂肪細胞では, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8) mRNA の発現が認められたが, XCL2 (Lymphotactin  $\beta$ ) 及び CX3CL1 (Fractalkine) mRNA の発現は認められなかった。

#### IV. 考 察

脂肪組織は主に, 中性脂肪を貯蔵し, 飢餓時に遊離脂肪酸を遊離する組織であると考えられていた。しかし, 1990年代に肥満ラットの脂肪細胞に TNF- $\alpha$  mRNA が発現していることが報告<sup>7)</sup> されて以来, 脂肪組織は内分泌臓器であると位置付けられた<sup>8)</sup>。肥満では, 脂肪組織内にマクロファージの遊走・浸潤が認められる<sup>9)</sup>。また, 中性脂肪の蓄積して肥大化した内臓脂肪細胞を伴う肥満では, リンパ球やマクロファージなどの脂肪組織在住の免疫細胞による

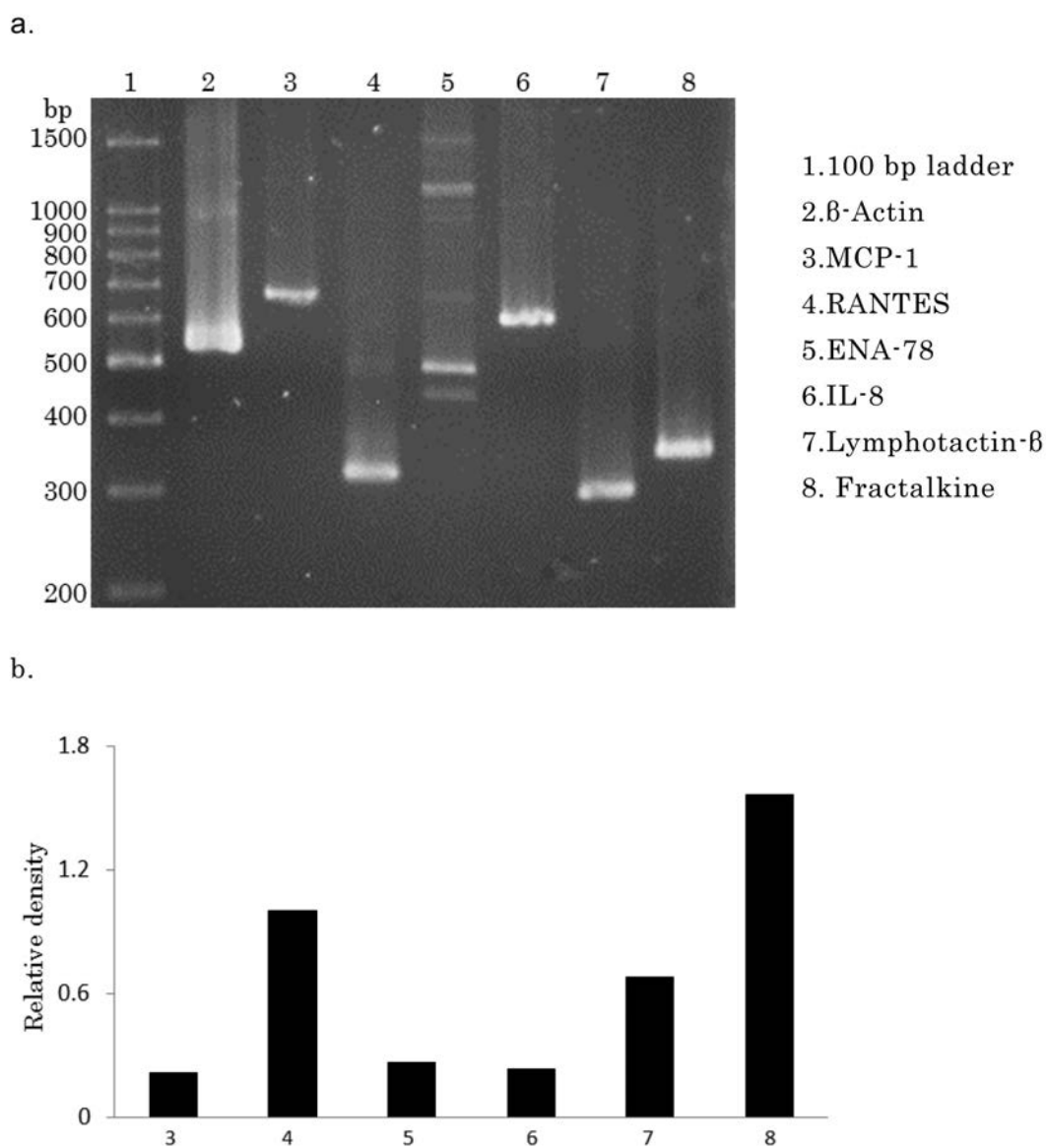


図 1. >30 kg/m<sup>2</sup> BMI 由来の脂肪細胞 mRNA の PCR 産物解析

a. PCR 産物のアガロース電気泳動を示す。

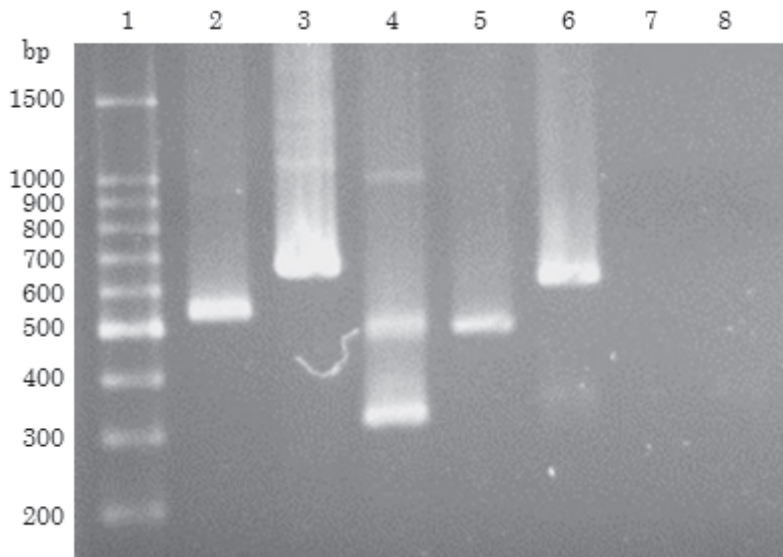
b. ケモカイン遺伝子の発現を  $\beta$ -Actin の発現量で補正した Relative density を示す。

炎症性サイトカインの上昇に伴う低グレードの慢性炎症状態を呈する。つまり、肥満では脂肪組織内への種々の免疫細胞の遊走・浸潤を特徴とする。特に、慢性炎症反応は炎症性マクロファージの浸潤と炎症関連遺伝子の発現が先行することが知られている<sup>9)</sup>。脂肪組織では、走化性サイトカインであるケモカインが炎症局所への白血球の遊走・浸潤に重要な役割を演じている。肥大化した内臓脂肪細胞からMCP-1やIL-8が産生され、肥満に由来する慢性炎症反応を惹起する。また、ケモカインレベルと肥満のパラメーターであるBMIが密接に関連している

ことが報告された<sup>10)</sup>。

ケモカインはCC, CXC, C, CX3Cの4種類に分類される。本研究ではヒト凍結内臓前駆脂肪細胞を分化・誘導した成熟脂肪細胞のケモカインmRNAの発現を検索した。CCケモカインであるMCP-1及びRANTES mRNAはBMI>30 kg/m<sup>2</sup>群及びBMI<30 kg/m<sup>2</sup>群の内臓脂肪細胞で認められた。regulated on activation, normal T cell expressed and secrete (RANTES)は、単球、CD4陽性T細胞及び好酸球の遊走因子である<sup>11)</sup>。メタボリック症候群を伴う肥満者では、皮下脂肪組織

a.



b.

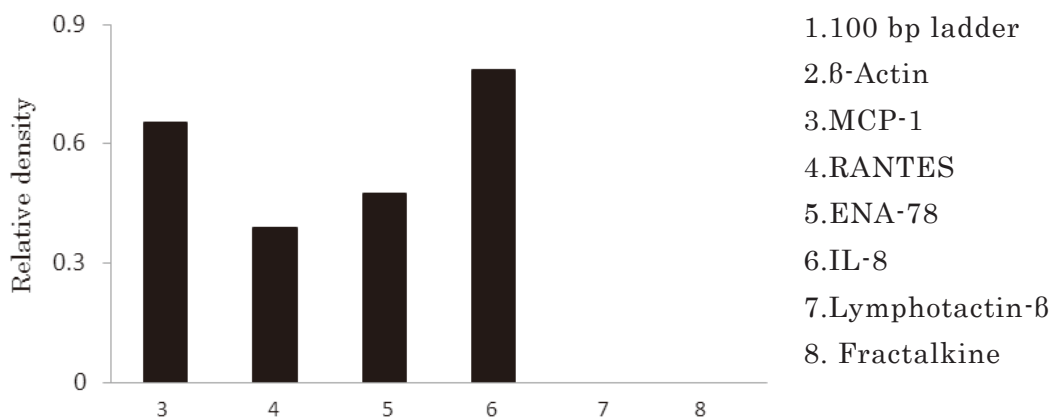


図2. <30 kg/m<sup>2</sup> BMI由来の脂肪細胞 mRNAのPCR産物解析

a. PCR産物のアガロース電気泳動を示す。

b. ケモカイン遺伝子の発現をβ-Actinの発現量で補正したRelative densityを示す。

より内臓脂肪組織に RANTES mRNA の発現が有意に増強している<sup>12)</sup>。BMI>30 kg/m<sup>2</sup>群及び BMI<30 kg/m<sup>2</sup>群の両群で、CXC ケモカインである ENA-78や IL-8 mRNA の発現が認められた。Epithelial neutrophil activating peptide-78 (ENA-78) は、強力な好中球遊走因子の一つである<sup>13)</sup>。マウスを用いた研究では、高脂肪食摂取に伴い好中球の内臓脂肪組織内への一過性浸潤が起こることが報告された<sup>4)</sup>。肥満に伴う内臓脂肪組織の慢性炎症反応の炎症カスケードの初期段階では、マクロファージの浸潤に先行して起こる好中球の遊走・浸潤が重要である。また、肥満者では、IL-8が脂肪細胞から産生される。その結果、血中 IL-8濃度が著増することが報告された<sup>14)</sup>。本研究でも同様に BMI>30 kg/m<sup>2</sup>群の内臓脂肪細胞では、MCP-1, RANTES, ENA-78, IL-8 mRNA の発現が認められた。しかし、BMI>30群と BMI<30群の内臓脂肪細胞では、Cと CX3C ケモカインの発現に相違が認められた。Cと CX3C ケモカインは immune modulators として作用する<sup>15)</sup>。C ケモカインである Lymphotactin は、単球や好中球ではなくリンパ球に対する遊走因子として報告された<sup>16)</sup>。更に、CM-1/lymphotactin は活性化 CD8<sup>+</sup> T 細胞から産生されるケモカインである<sup>17)</sup>。このように lymphotactin は T 細胞, B 細胞, 好中球の遊走・浸潤に重要な役割を演じている<sup>18)</sup>。

C ケモカインには、XCL1/lymphotactin- $\alpha$  と XCL2/lymphotactin- $\beta$  の 2 種類がある。一方、CX3C ケモカインには、CX3CL1/ fractalkine の 1 種類しか存在しない。白血球の炎症局所への遊走・浸潤には主にセクレチンやインテグリンなどの接着因子と走化性因子であるケモカインを必要とする。Fractalkine は、白血球の血管内皮細胞への接着を惹起することが報告されている<sup>19)</sup>。また、Fractalkine は活性化した血管内皮細胞表面に結合した分子で、T 細胞, 単球, NK 細胞との強固な接着を誘導する。また、樹状細胞の成熟に伴って細胞表面上で発現が増強することが判明している<sup>20)</sup>。また、Fractalkine は 2 型糖尿病の発症と深く関与しているアディポケモカインであることが知られている<sup>21)</sup>。

肥満では、内臓脂肪組織の low-grade の炎症反応が起こっており、脂肪細胞と T 細胞の相互作用が報告された。CD4<sup>+</sup> ヘルパー T 細胞と CD8<sup>+</sup> 細胞障害性 T 細胞の細胞数が BMI と正の相関を示し、

また、T 細胞は、皮下脂肪組織より内臓脂肪組織に多数浸潤する。脂肪細胞で産生されるケモカインにより、T 細胞が脂肪組織へ遊走・浸潤し脂肪生成に深く関与している。このように脂肪細胞と T 細胞のクロストークの存在が示唆された<sup>22)</sup>。高度肥満に伴う種々の病態形成には、脂肪細胞から産生されるケモカイン、特に、C と CX3C ケモカインが重要な役割を演じていることが示唆された。

## V. 結 語 (おわりに)

ヒト内臓脂肪細胞由来の凍結内臓前駆脂肪細胞を分化誘導して得られた成熟脂肪細胞には、ケモカインの遺伝メッセンジャーが残されており、肥満に伴う脂肪組織における炎症反応に進行過程が想定できることが示唆された。

## 謝 辞

本研究は熊本保健科学大学研究費24-A-3により実施された。

## 文 献

- 1) Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 282 : 2131-2135, 1999.
- 2) Ramos EJ, Xu Y, Romanova I, et al. Is obesity an inflammatory disease? *Surgery* 134 : 329-335, 2003.
- 3) Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56 : 1010-1013, 2007.
- 4) Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 49 : 1894-1903, 2008.
- 5) Kintscher U, Hartge M, Hess K, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler*

- Thromb Vasc Biol 28 : 1304-1310, 2008.
- 6) Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, et al. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 : 193-199, 2010.
  - 7) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259 : 87-91, 1993.
  - 8) Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2 : 31-56, 2007.
  - 9) Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112 : 1796-808, 2003.
  - 10) Kim CS, Park HS, Kawada T, et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes* 30 : 1347-1355, 2006.
  - 11) Alam R, Stafford S, Forsythe P, et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 150 : 3442-3448, 1993.
  - 12) Wu H, Ghosh S, Perrard XD, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115 : 1029-1038, 2007.
  - 13) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, et al. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest* 94 : 1012-1018, 1994.
  - 14) Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, et al. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E8-13, 2004.
  - 15) Stievano L, Piovan E, Amadori A. C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications. *Crit Rev Immunol* 24 : 205-228, 2004.
  - 16) Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266 : 1395-1399, 1994.
  - 17) Yoshida T, Imai T, Takagi S, et al. Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin. *FEBS Lett* 395 : 82-88, 1996.
  - 18) Huang H, Li F, Cairns CM, et al. Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun* 281 : 378-382, 2001.
  - 19) Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385 : 640-644, 1997.
  - 20) Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, et al. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 29 : 2551-2559, 1999.
  - 21) Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, et al. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 60 : 1512-1518, 2011.
  - 22) Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, et al. Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 : 1608-1614, 2009.

(平成27年1月31日受理)

## Chemokine profile of visceral adipocytes derived from severe obesity

Rui YAMAGUCHI

Obesity is recognized as a low-grade chronic inflammatory state which involves a chemokine network contributing to a variety of diseases. Chemokines have been classified into four main subfamilies including CXC, CC, CX3C and XC. Obesity is associated with inflammatory cell accumulation in adipose tissue. This study investigated chemokine expression in human visceral adipocytes determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). Human adipocytes were derived from cryopreserved omental preadipocytes. These fibroblast-like precursor cells are cryopreserved at the end of primary culture and can be propagated two passages prior to differentiating into human adipocytes. Body mass index (BMI) correlates with the amount of body fat. Visceral adipocytes obtained from <30 BMI subject showed that MCP-1(CCL2), RANTES (CCL5), ENA-78 (CXCL5), and IL-8 (CXCL8) mRNA. Contrarily, adipocytes from >30 BMI demonstrated that MCP-1, RANTES, ENA-78, IL-8, lymphotactin-  $\beta$  (XCL2), and fractalkine (CX3CL1) mRNA. XC and CX3C chemokines play an important role for obesity-related inflammation as immune modulators. This suggests that interplay between human adipocytes and T lymphocytes is important in obesity.