

FABP5 ノックアウトマウスを用いた慢性炎症の分子機構の解析 (20-47)

主任研究者 川口 耕一郎 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 (特任研究員)

研究要旨

近年、加齢性疾患に共通する基盤病態として慢性炎症が注目されている。なかでも、肥満状態では全身に軽度な慢性炎症が起こっており、これは増大した脂肪組織に炎症が起きている結果であるとわかってきた。しかしながら、なぜ加齢に伴って脂肪組織で炎症が見られるようになるのか、その分子機構については多くが不明である。このような背景の中、申請者は、加齢とともに発現が亢進し、炎症性シグナルの活性化に関与する分子として上皮細胞型脂肪酸結合タンパク質 (FABP5) を見出している。FABP5 は高脂肪食摂取により誘導される皮膚炎発症に関与することや、FABP5 阻害剤に抗炎症効果があることが報告されており、炎症の発症において重要な役割を果たすことが強く示唆される一方で、これらの詳細な分子メカニズムについては未だ不明である。従って、脂肪組織をはじめとする各組織での FABP5 の機能を解析し、炎症性シグナル活性化における FABP5 の役割を明らかにすることで、加齢に伴う慢性炎症の病態解明に繋がると考えられる。

本研究課題は、生体の脂質恒常性に着目し、FABP5 ノックアウトマウスを用いて、加齢に伴って発症する慢性炎症における FABP5 の役割を明らかにし、FABP5 を標的とした慢性炎症の治療応用へと展開するための分子基盤を確立することを目的としている。2020年度は、FABP5 ノックアウトマウスの準備と、炎症性シグナル活性化における FABP5 の役割を明らかにするため、*in vitro* での FABP5 機能解析を行った。

主任研究者

川口 耕一郎 国立長寿医療研究センター 老化機構研究部 (特任研究員)

分担研究者

なし

A. 研究目的

加齢に伴って様々な組織で慢性的な炎症が惹起され、癌や生活習慣病を発症することが示唆されている (Cell 144:646-674)。特に、脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸や生理活性物質が、血管や臓器に炎症を引き起こすことが報告され注目が集まっている (J Clin Invest. 116:1784-1792, Nature 444:847-853)。炎症と FABP5 の関連に関しては、FABP5 が高脂肪食摂取により誘導される皮膚炎発症に関与することが報告されている (Immunity 42:953-964)。さらに、FABP5 KO マウスでは、肝臓における抗炎症性サイトカイン分泌が亢進することや (Mol Immunol. 67:265-275)、FABP5 阻害剤に抗炎症効果があることも報告されている (J Biol Chem. 293:5295-5306)。以上のように、FABP5 が炎症の発症において重要な役割を果たすことが強く示唆される一方で、これらの詳細なメカニズムについては未だ不明である。従って、脂肪組織をはじめとする各組織での FABP5 の機能を解析し、炎症性シグナル活性化における FABP5 の役割を明らかにすることで、加齢に伴う慢性炎症の病態解明に繋がると考えている。本研究は、申請者がこれまでに蓄積してきた FABP5 に関する知見や解析手法を駆使することで、未だ不明な点の多い FABP5 の基礎研究を進展させ、FABP5 を標的とした慢性炎症治療への臨床応用を目指して取り組む課題である。

B. 研究方法

(1) 組織特異的 FABP5 ノックアウト (KO) マウスの作製

これまでにいくつかのグループによって FABP5 KO マウスの解析が報告されているが、全て全身性の KO による解析である。FABP5 はユビキタスに発現している分子である。従って、脂肪組織などの各組織における FABP5 の詳細な機能を明らかにするためには組織特異的 KO による解析が必要不可欠であることから、FABP5 flox マウスを CRISPR-Cas9 システムを用いて作製する。その後、組織特異的 Cre 発現マウスと交配させ、組織特異的 FABP5 KO マウスを作製する。これと並行して、全身性の FABP5 KO マウスも利用できるように準備する。

(2) 炎症性シグナル活性化における FABP5 の役割の解明

KO マウスの作製期間中には、*in vitro* での FABP5 機能解析を進める。具体的には、炎症を起こした脂肪組織にはマクロファージの浸潤が増加し、脂肪酸や TNF- α などの液性因子を介して脂肪細胞と相互作用し、炎症性変化を増強することが知られている。そこで、マクロファージのモデルとして RAW264.7 細胞 (マウスマクロファージ様細胞) を用いて、FABP5 発現量を RNAi 法により抑制した場合や、FABP5 阻害剤を培地に添加した場合の炎症性シグナルの変化を定量 PCR 法や ELISA 法で調べる。

(倫理面への配慮)

本研究計画には動物実験が含まれている。本研究に関する動物実験の実施に関しては、日本学術会議により出された「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守する。実験動物の福祉を踏まえ、使用および処分に関する苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会により承認を受け、研究機関が定めた動物実験取扱規定に則って実施する。

C. 研究結果

(1) 組織特異的 FABP5 KO マウスの作製について

当初、組織特異的 FABP5 KO マウスの作製については、外部の研究協力者の協力を得て FABP5 flox マウスを作成する予定であったが、新型コロナウイルスの影響による制限が多く大幅な遅れが生じてしまい、本年度中の作製は断念せざるを得なかった。

(2) 炎症性シグナル活性化における FABP5 の役割の解明について

RAW264.7 細胞を用いて、FABP5 発現量を RNAi 法により抑制すると、IL-1 β mRNA の発現量が減少することがわかった (図 1 左)。また、細胞培養上清中に分泌される IL-1 β タンパク質量を ELISA 法にて定量したところ、同様に減少していた (図 1 右)。次に、IL-1 β の発現を制御する上流因子の解析を進めた結果、FABP5 ノックダウンにより、NF- κ B p65 のリン酸化レベルが減少していることがわかった。

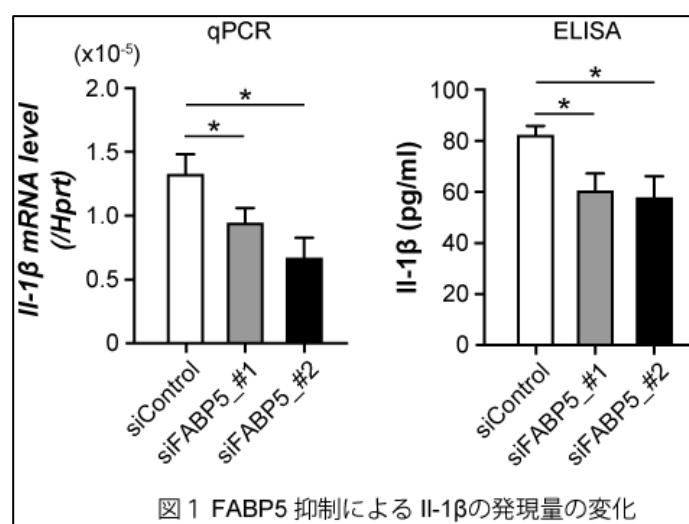


図 1 FABP5 抑制による IL-1 β の発現量の変化

D. 考察と結論

炎症性シグナル活性化における FABP5 の役割を明らかにするため、RAW264.7 細胞を用いた解析を行った結果、FABP5 ノックダウンにより① IL-1 β 発現量の減少、② NF- κ B p65 のリン酸化レベルの低下が見られた。したがって、FABP5 はマクロファージにおいて炎症性シグナルの一つである NF- κ B シグナルを制御していることが示唆された。今後はマウスの組織を用いて、生体においても同様のシグナル変化が見られるかを解析する予定である。

KO マウスを用いた解析については、組織特異的 FABP5 KO マウスの作製に遅れが生じたため、全身性の FABP5 KO マウスを利用した実験の準備を進めた。本研究課題は、加齢による脂肪組織の炎症状態を解析することを目的としており、現在、FABP5 ノックアウトマウスの加齢育成は順調に進行している。また今後、自然加齢による炎症状態の解析に加え、高脂肪食負荷を与えた場合の炎症状態の解析を進めていく予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Kawaguchi M. Hashimoto and M. Sugimoto (2021) An antioxidant suppressed lung cellular senescence and enhanced pulmonary function in aged mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **541**, 43-49
- 2) R. Mikawa, T. Sato, Y. Suzuki, H. Baskoro, K. Kawaguchi and M. Sugimoto (2020) p19Arf Exacerbates Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Dysfunction. *Biomolecules* **10**, 462

2. 学会発表

- 1) K. Kawaguchi, and M. Sugimoto 「Senescence-dependent alveolar factor promotes metastatic lung cancer」 Virtual Cold Spring Harbor meeting : Mechanisms of Aging, September 22 -25, 2020

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし