

炎症性サイトカインが脂肪細胞の血管新生因子と
タンパク分解関連因子の発現に及ぼす影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

柴田 知佳

(指導：川戸 貴行 教授, 中井 久美子 助教)

概 要

脂肪組織の血管網と細胞外基質の継続的なリモデリングは、酸素と栄養素の適切な供給と十分な空隙を脂肪細胞にもたらし。一方、血管形成の相対的な減少と細胞外基質タンパクの代謝回転の遅延は、脂肪組織の代謝能力を低下させ、糖尿病や動脈硬化性疾患のリスクにつながる有害因子の増加を招くと考えられている。脂肪細胞は、vascular endothelial cell growth factor (VEGF) A や hepatocyte growth factor (HGF) などの血管新生因子を産生し、脂肪組織の血管形成に関与する。また、脂肪細胞はI型コラーゲンをはじめとする細胞外基質タンパクとともに、タンパク分解酵素 matrix metalloproteinases (MMPs) とその内因性阻害因子 tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) を発現し、細胞外基質のリモデリングを調節している。

慢性歯周炎やリウマチ性疾患などの局所または全身的な炎症性疾患が、心血管疾患、肥満、および代謝異常の発症と関連し、また、これらの炎症性疾患を有する患者は健常者に比べ、血中の interleukin (IL)-6 と tumor necrosis factor (TNF)- α のレベルが高いことが知られている。すなわち、局所または全身的に増加する炎症性サイトカインが、脂肪組織の増大化や機能不全に影響することが示唆される。そこで本研究では、肥満の進行の初期と後期のそれぞれの段階を想定し、含有する脂肪滴が小さい未成熟脂肪細胞と、大滴化した脂肪を有する成熟脂肪細胞を IL-6 または TNF- α で刺激し、血管新生因子、I型コラーゲン、MMPs および TIMPs の発現を調べた。また、脂肪細胞由来の培養上清を含む conditioned medium がヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) による管様構造形成に及ぼす影響についても検討した。

脂肪前駆細胞である 3T3-L1 を分化誘導した初期 (4~5 日目) と後期 (14~15 日目) にそれぞれ認められる未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞を 0.01 ng/mL の IL-6 または TNF- α で 12 時間刺激した。血管新生因子である VEGFA, HGF, angiopoietin (ANG)-1 および ANG-2, ならびに I型コラーゲン, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 および TIMP-2 の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。また、脂

脂肪細胞の培養上清中の VEGFA, HGF, ANG-1 および ANG-2 のタンパクを ELISA 法で調べた。さらに、脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で HUVEC を培養後、管様構造の形成を顕微鏡で観察し、管の長さを計測した。

血管新生因子の遺伝子発現を調べた結果、未成熟脂肪細胞の VEGFA, HGF, および ANG-2 の遺伝子発現は、未刺激に比べて IL-6 または TNF- α の刺激で増加し、ANG-1 の発現は減少した。一方、成熟脂肪細胞の VEGFA, HGF, および ANG-2 の遺伝子発現は、これらの炎症性サイトカインの刺激で減少した。また、成熟脂肪細胞の ANG-1 の遺伝子発現は、IL-6 の刺激で有意に増加したが、TNF- α の刺激の影響は認められなかった。次に、これら血管新生因子のタンパク発現を調べた結果、HGF のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 または TNF- α の刺激で増加し、成熟脂肪細胞では減少した。VEGFA のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 または TNF- α の刺激で増加し、成熟脂肪細胞では IL-6 の刺激でのみ減少した。ANG-2 のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 と TNF- α の刺激で増加したが、成熟脂肪細胞ではこれらのサイトカイン刺激の影響は認められなかった。ANG-1 のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 と TNF- α の刺激で減少したが、成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった。

さらに、HUVEC による管様構造の形成を調べた結果、未刺激に比べて IL-6 または TNF- α で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で培養した HUVEC で、より多くの管様構造が認められた。顕微鏡視野中の管の長さの平均は、IL-6 または TNF- α で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で増加した。一方、成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で培養した HUVEC の管様構造の形成には、脂肪細胞への炎症性サイトカインの刺激の影響は認められなかった。

次に、脂肪細胞の I 型コラーゲン, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 および TIMP-2 の遺伝子発現を調べた。その結果、未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞の I 型コラーゲンの遺伝子発現に、IL-6 と TNF- α の刺激の影響は認められなかった。一方、MMP-13 の遺伝子発現は、未成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められず、成熟脂肪細胞では IL-6 と TNF- α の刺激で減少した。MMP-14 の遺伝子発現は、未成

熟脂肪細胞では IL-6 と TNF- α の刺激で増加し、成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった。また、TIMP-1 と TIMP-2 の遺伝子発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 と TNF- α の刺激で減少した一方で、成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった。

以上の結果から、IL-6 と TNF- α は未成熟脂肪細胞における血管新生因子の発現を増加させ、血管形成を誘導することが明らかとなった。また、未成熟脂肪細胞への IL-6 と TNF- α の刺激は細胞外基質タンパク分解を促進し、成熟脂肪細胞への刺激はこれを抑制すると考えられた。すなわち、これらの炎症性サイトカインは、脂肪細胞を介した血管新生と細胞外基質タンパクの分解バランスを変化させて、脂肪組織の過度な増大化と機能不全を惹起する可能性が示唆された。

本論文は、*Biochemical and Biophysical Research Communications* (531: 297-304, 2020) に掲載された論文 (Shibata et al. Effects of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α on the expression of angiogenic and collagenolytic factors in premature and mature adipocytes) を基幹論文とし、これに interleukin-6 と tumor necrosis factor- α 刺激が脂肪細胞の MMP-14 と TIMP-2 の発現に及ぼす影響を調べた結果 (Fig. 7) を加えて総括したものである。

緒 言

脂肪細胞は脂肪組織に認められ、カロリーの摂取が消費を上回ると脂質を貯蔵しながら、その大きさを増す。脂肪組織の血管網と細胞外基質の継続的なリモデリングは、酸素と栄養素の適切な供給と十分な空隙を脂肪細胞にもたらし、脂肪組織が生理的に増大することに寄与している¹⁾。一方で、カロリーの慢性的な過剰摂取による脂肪組織の過度な増大は、脂肪生成(脂肪細胞の増加)と血管形成の不均衡を招く²⁾。血管形成の相対的な減少と細胞外基質タンパクの代謝回転の遅延は、脂肪組織の代謝能力を低下させ、糖尿病や動脈硬化性疾患のリスクにつながる有害因子の増加を招くと考えられている^{3,4)}。

脂肪組織の低酸素状態は、組織が増大化するとともに生じ、血管形成を誘導することが知られている^{2,3)}。高脂肪食の摂取で急速に体重が増加したラットの脂肪組織は低酸素となり^{5,6)}、また、低酸素下で培養した脂肪細胞では血管新生因子の産生が増加する⁷⁾。しかし、脂肪組織における血管形成は複雑に調節されており¹⁻³⁾、脂肪生成と血管形成の不均衡が生じるメカニズムの解明は十分になされていない。実際、痩身の者に比べて肥満の者では、脂肪組織における酸素分圧が上昇し血管形成は不十分であったとの報告⁸⁾も認められる。

肥満の者は、慢性炎症の状態を呈することが知られている。過度に増大した脂肪組織に認められるマクロファージは、脂肪の過剰な貯蔵により死に至った脂肪細胞を処理して炎症性サイトカインを産生する^{2,9)}。脂肪組織で産生される炎症性サイトカインに、interleukin (IL)-6 と tumor necrosis factor (TNF)- α がある。血清中のこれら2つのサイトカインのレベルは、body mass index の増加に比例して上昇することが知られている¹⁰⁾。加えて、慢性歯周炎やリウマチ性疾患など局所または全身的な炎症性疾患もまた、心血管疾患、肥満、および代謝異常の発症と関連する^{11,12)}。これらの炎症性疾患を有する患者は健常者に比べ、血中のIL-6 と TNF- α のレベルが高いことも報告されている^{13,14)}。これらの知見から、局所または全身的に増加する炎症性サイトカインが脂肪組織の増大化や機能に影響することが示唆される。

IL-6 と TNF- α が脂肪細胞に及ぼす影響は、様々に検討されている。TNF- α で

脂肪細胞を刺激すると、アテローム性動脈硬化症の発症に関係する plasminogen activator inhibitor-1 と monocyte chemoattractant protein-1 の産生が誘導される^{15,16)}。また、IL-6 による脂肪細胞の刺激は、細胞内へのグルコースの取り込みを調節する adiponectin の分泌を抑制する¹⁷⁾。脂肪細胞は、vascular endothelial cell growth factor (VEGF) A や hepatocyte growth factor (HGF) などの血管新生因子を産生し、脂肪組織の血管形成に関与する^{1,2)}。しかしながら、IL-6 と TNF- α が脂肪細胞の血管新生因子の産生に及ぼす影響は、これまで十分に検討されていない。

本研究では、肥満の進行の初期と後期のそれぞれの段階を想定し、含有する脂肪滴が小さい未成熟脂肪細胞と、大滴化した脂肪を有する成熟脂肪細胞を IL-6 または TNF- α で刺激し、VEGFA と HGF を含む 4 種の血管新生因子、I 型コラーゲンならびにタンパク分解酵素とその内因性阻害因子の発現を調べた。また、脂肪細胞由来の培養上清を含む conditioned medium がヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) による管様構造形成に及ぼす影響についても検討した。

材料および方法

1. 3T3-L1 細胞の培養と脂肪細胞の分化

脂肪前駆細胞である 3T3-L1 の培養は、先行研究¹⁸⁾を参考に行った。すなわち、細胞を 6-well プレートに 3.0×10^4 cell/cm² の密度で播種し、10% ウシ胎児血清 (FBS; Gibco-BRL) と 1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Sigma-Aldrich) を添加した高グルコース含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL) を培地として用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。細胞がコンフルエントに達した段階で、AdipoInducer (Takara Bio) に同梱のインスリン、イソブチル-メチルキサンチンおよびデキサメタゾン、それぞれ 1 μ M、0.5 μ M および 0.1 μ M 添加した培地で 2 日間培養した。その後、1 μ M インスリンを含む培地を 2 日ごとに交換し、脂肪細胞への分化を維持した。脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化は、オイルレッド O (Sigma-Aldrich) で染色される脂質の蓄積で確認した。分化培養の初期 (4~5 日目) の小さい脂肪滴を含有する細胞を未成熟脂肪細胞 (Fig. 1A)、分化培養の後期 (14~15 日目) の大滴化した脂肪を有する細胞を成熟脂肪細胞 (Fig. 1B) とした。脂肪の含有量の半定量化として、染色後の細胞からイソプロパノールでオイルレッド O を抽出して、吸光度を測定した (Fig. 1C)。

2. IL-6 と TNF- α による細胞の刺激

未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞を FBS 非含有の培地で 6 時間、静置した後、IL-6 または TNF- α で 12 時間刺激した。細胞を刺激する IL-6 と TNF- α の濃度は、関節リウマチと慢性歯周炎患者の血清中の IL-6 と TNF- α のレベルを調べた先行研究^{13, 14)}を参考に 0.01 ng/mL とした。

3. Real-time PCR

IL-6 または TNF- α で刺激した細胞から NucleoSpin RNA (Takara Bio) を用いて全 RNA を抽出し、分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) で RNA

濃度を測定した。RNA PCR kit (Takara Bio) を用いて 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の RNA から complementary DNA (cDNA) を作成し、SYBR Green I による real-time RT-PCR を行った。滅菌水で 2 倍に希釈した cDNA 溶液 2 μL と Table 1 に示すプライマーを 10 μM 含む SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) 溶液を、Thermal Cycler Dice Real-Time System (Takara Bio) を用いて PCR 反応した。反応は、95°C で 5 秒間および 60°C で 30 秒間からなるサイクルを 40 回繰り返した。PCR 産物の特異性は融解曲線分析に基づいて装置のソフトウェアで確認した。2 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法で遺伝子の増幅量を求め、house keeping 遺伝子である 36B4 の増幅量で補正した値を遺伝子発現量とした。

4. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

細胞を IL-6 または TNF- α で 12 時間刺激後、培養上清を回収し、血管新生因子である VEGFA, HGF, angiopoietin (ANG)-1 および ANG-2 のタンパクレベルを市販の ELISA kit (VEGFA; Novus Biologicals, ANG-1; Cloud Clone Corporation, ANG-2, HGF; R&D Systems) を用いて測定した。各標的タンパクの濃度は、ELISA キットに含まれるコントロールペプチドで作成された標準曲線に基づいて計算した。

5. In vitro tube formation assay

I 型コラーゲン溶液 (新田ゼラチン) でコーティングした 12-well プレートに HUVEC (Lonza) を 1.0×10^5 cell/well の密度で播種し、SingleQuots (Lonza) を添加した endothelial cell basal medium (Lonza) で 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養した。その後 DMEM に脂肪細胞由来の培養上清を加えた conditioned medium に培地を交換して 24 時間培養し、HUVEC による管様構造の形成を顕微鏡で観察した。また、無作為に選んだ 10 視野の画像から管様構造の長さの平均を算出した。

6. 統計学的分析

結果は平均値と標準偏差で表した。統計処理は、一元配置分散分析後、Tukeyの多重比較を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

1. 脂肪細胞の血管新生因子の遺伝子発現に及ぼす IL-6 と TNF- α の影響

未成熟脂肪細胞の VEGFA, HGF, および ANG-2 の遺伝子発現は, 刺激なし (コントロール) に比べて IL-6 または TNF- α の刺激で有意に増加し, ANG-1 の発現は有意に減少した (Fig. 2A-D)。一方, 成熟脂肪細胞の VEGFA, HGF, および ANG-2 の遺伝子発現は, コントロールと比較してこれらの炎症性サイトカインの刺激で有意に減少した (Fig. 2 E, F, H)。また, 成熟脂肪細胞の ANG-1 の遺伝子発現は, IL-6 刺激で有意に増加したが, TNF- α 刺激の影響は認められなかった (Fig. 2 G)。

2. 脂肪細胞の血管新生因子のタンパク発現に及ぼす IL-6 と TNF- α の影響

刺激なし (コントロール) での VEGFA と HGF のタンパク発現は, 未成熟脂肪細胞に比べて成熟脂肪細胞で有意に高かった (Fig. 3A, B)。HGF のタンパク発現は, 未成熟脂肪細胞ではコントロールに比べて IL-6 または TNF- α 刺激で有意に増加し, 成熟脂肪細胞では有意に減少した。炎症性サイトカイン刺激による VEGFA のタンパク発現も同様の変化が認められたが, HGF に比べて刺激の影響は小さかった。すなわち, 未成熟脂肪細胞ではコントロールに比べて IL-6 または TNF- α の刺激で有意に増加し, 成熟脂肪細胞では IL-6 の刺激でのみ有意に減少した。ANG-2 のタンパク発現は, 未成熟脂肪細胞ではコントロールに比べて IL-6 と TNF- α の刺激で有意に増加したが, 成熟脂肪細胞ではこれらのサイトカイン刺激の影響は認められなかった (Fig. 3D)。ANG-1 のタンパク発現は, 未成熟脂肪細胞ではコントロールに比べて IL-6 と TNF- α の刺激で有意に減少したが, 成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった (Fig. 3C)。刺激なしでの ANG-1 と ANG-2 の発現は, 未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞の間で違いは認められなかった。

3. IL-6 と TNF- α で刺激した脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium が HUVEC による管様構造の形成に及ぼす影響

IL-6 または TNF- α で刺激した脂肪細胞,あるいは刺激なし (コントロール) の脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で HUVEC を培養し,管様構造の形成を調べた。管様構造は,コントロールに比べて IL-6 または TNF- α で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で培養した HUVEC で,より多く認められた (Fig. 4A-C)。管の長さの平均値も,コントロールに比べて IL-6 または TNF- α で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で有意に増加した (Fig. 4E)。培養上清を含まない DMEM に比べて刺激なし (コントロール) の未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で培養した HUVEC で,管様構造の形成は促進した (Fig. 4A, D, E)。一方,成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で培養した HUVEC の管様構造の形成には,脂肪細胞への炎症性サイトカインの刺激の影響は認められなかった (Fig. 5A-D)。

4. 脂肪細胞の I 型コラーゲン, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 および TIMP-2 の遺伝子発現に及ぼす IL-6 と TNF- α の刺激の影響

未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞の I 型コラーゲンの遺伝子発現に,IL-6 と TNF- α の刺激の影響は認められなかった (Fig. 6A, D)。MMP-13 の遺伝子発現は,未成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかったが,成熟脂肪細胞では刺激なし (コントロール) に比べて IL-6 と TNF- α の刺激で有意に低下した (Fig. 6B, E)。MMP-14 の遺伝子発現は,未成熟脂肪細胞ではコントロールに比べて IL-6 と TNF- α の刺激で有意に増加し,成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった (Fig. 7A, C)。また, TIMP-1 と TIMP-2 の遺伝子発現は,未成熟脂肪細胞ではコントロールに比べて IL-6 と TNF- α の刺激で有意に減少した一方で,成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった (Fig. 6C, F and Fig. 7B, D)。

考 察

本研究では、炎症性サイトカインである IL-6 と TNF- α が、脂肪細胞の血管新生因子、I 型コラーゲンおよびタンパク分解酵素とその内因性阻害因子の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、これらの発現に及ぼす炎症性サイトカインの影響は脂肪細胞の成熟度合で異なり、炎症性サイトカインによって脂肪細胞による血管新生と細胞外基質のリモデリングの調節機能が変化する可能性が示唆された。

脂肪組織の血管網は、脂肪細胞へ分化する前の脂肪前駆細胞の間にも認められる³⁾。しかし、脂肪組織の血管新生に関する研究の多くが成熟脂肪細胞に着目しており、酸素レベル⁷⁾、天然物または薬剤^{19,20)}などの影響が報告されている。分化の程度の違いについては 3T3-F442 細胞を用いた研究で、成熟脂肪細胞の培養上清に比べて未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium では、内皮細胞による管形成が少ないことが報告されている²¹⁾。本研究でも未成熟脂肪細胞に比べて成熟脂肪細胞が、血管新生因子である VEGFA と HGF をより多く発現しており、前述の先行研究の知見と一致する結果であった。一方、本研究では、TNF- α または IL-6 で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清は、HUVEC の管様構造の形成を促進することが明らかになった。培養上清中の VEGF, HGF および ANG-2 のタンパクレベルも TNF- α と IL-6 の刺激で増加したことから、TNF- α と IL-6 は未成熟脂肪細胞の血管新生因子の発現を増加させ、HUVEC による管様構造の形成を誘導したと考えられる。

本研究では、IL-6 と TNF- α の刺激は、ANG-1 と ANG-2 の発現に異なる影響を示した。すなわち、IL-6 と TNF- α の刺激は、未成熟脂肪細胞の ANG-1 ではなく ANG-2 の発現増加を誘導した。Voros ら²²⁾ は、肥満モデルマウスと C57Bl/6 マウスに高脂肪食を与えて肥満を発症させ、脂肪組織における血管網の伸展と血管新生因子の遺伝子発現に及ぼす影響を調べている。その結果、脂肪組織の増大が、血液量、血管の容積ならびに ANG-2 発現の増加と ANG-1 発現の減少を伴って生じたと報告している²²⁾。彼らの研究の知見と本研究結果から、炎症性

サイトカインは高脂肪摂取に類似する影響を ANG-2 の発現に及ぼし、また、ANG-1 は血管形成に抑制的に作用すると考えられた。

VEGF は、内皮細胞の増殖と遊走を促進するといった血管新生因子としての特徴を強く示すことが知られている^{1,23)}。HGF もまた、血管形成に重要な役割を果たしており¹⁾、その発現変化が冠状動脈性心疾患と関連する²⁴⁾。Saiki ら²⁵⁾は、VEGF と HGF の血管形成への関与を調べ、siRNA で HGF の発現を抑制した 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清では HUVEC による管形成が低下したが、同様の方法で VEGF の発現を抑制した 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清は、管形成に影響しなかったと報告している。本研究では、IL-6 と TNF- α は未成熟脂肪細胞の ANG-2、HGF、VEGFA の発現を増加させたが、この効果は VEGFA に比べて HGF でより顕著であった。Saiki らの知見と本研究結果から、脂肪細胞を介した血管新生では VEGFA よりも ANG-2 と HGF の関与が大きいと考えられた。

本研究では、IL-6 と TNF- α は成熟脂肪細胞の VEGFA と HGF のタンパク発現を抑制したが、ANG-1 と ANG-2 の発現に刺激の影響は認められなかった。さらに、HUVEC による管様構造の形成は、TNF- α と IL-6 の刺激を受けた成熟脂肪細胞の培養上清でやや抑制されたが、刺激なしの成熟脂肪細胞の培養上清との間に顕著な差は認められなかった。これらの結果から、成熟脂肪細胞による血管新生の誘導では、ANG-1 と ANG-2 の役割が大きいと考えられた。

機能不全となった脂肪組織では、脂肪の過剰な生成と血管新生の減少に加えて、コラーゲンを含む細胞外基質タンパクの代謝にも変調が認められる^{2,26)}。遺伝性または高脂肪食負荷による肥満の発症では、脂肪組織の細胞外基質のリモデリングと血管新生が障害される^{27,28)}。本研究では、IL-6 と TNF- α は脂肪細胞の I 型コラーゲンの遺伝子発現に影響しなかった。一方、コラゲナーゼ活性を有する MMP-13 の発現は成熟脂肪細胞で減少し、基質特性が広く MMPs の活性化にも関与する MMP-14 の発現は未成熟脂肪細胞で増加した。また、IL-6 または TNF- α の刺激を受けた未成熟脂肪細胞では、MMPs の内因性阻害因子である TIMP-1 と TIMP-2 の発現が減少した。これらの結果から、IL-6 と TNF- α の刺激は、未成熟脂肪細胞の MMP-14 の発現を促進するとともに内因性阻害因子の発

現を抑制して、脂肪組織の増大に必要な空隙を生む細胞外基質タンパクの分解を誘導する可能性が示唆された。一方、IL-6 と TNF- α の刺激は、成熟脂肪細胞のコラゲナーゼ (MMP-13) の発現を抑制し、増大した脂肪組織のコラーゲンの代謝を遅延させる可能性が考えられた。すなわち、これらの炎症性サイトカインは、細胞外基質タンパクの分解バランスを変化させて、脂肪組織の過度な増大と機能不全を惹起する可能性が示唆された。

全身または局所的な慢性炎症性疾患では、血液中の炎症性サイトカインのレベルが高いことが知られている^{13, 14)}。また、炎症症状を呈する歯周病は、糖尿病、高血圧、肥満などの動脈硬化性疾患のリスクの増加と関連する^{12, 29)}。本研究では、IL-6 と TNF- α の濃度は、歯周炎患者の血中の炎症性サイトカイン量を調べた Gorska ら¹⁴⁾の研究を参考に決定した。すなわち、本研究の結果は、肥満とともに生じる代謝障害に慢性炎症性疾患が影響するメカニズムの一端を示すものと考えられた。

結 論

脂肪前駆細胞である 3T3-L1 の分化誘導初期と後期にそれぞれ認められる未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞を, IL-6 と TNF- α で刺激し, 血管新生因子 (VEGFA, HGF, ANG-1, ANG-2), I 型コラーゲンおよび, タンパク分解酵素 (MMP-13, MMP-14) とその内因性阻害因子 (TIMP-1, TIMP-2) の発現を調べた。また, 脂肪細胞由来の培養上清を含む conditioned medium でヒト臍静脈内皮細胞である HUVEC を培養し, 管様構造の形成状態を調べ, 以下の結論を得た。

1. IL-6 または TNF- α の刺激によって未成熟脂肪細胞の VEGFA, HGF および ANG-2 の発現は増加し, ANG-1 の発現は減少した。
2. IL-6 または TNF- α の刺激によって成熟脂肪細胞の VEGFA と HGF の発現は減少したが, ANG-1 と ANG-2 の発現に変化は認められなかった。
3. HUVEC の管様構造の形成は, IL-6 または TNF- α で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で促進したが, 成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium では刺激の影響は認められなかった。
4. IL-6 または TNF- α の刺激によって未成熟脂肪細胞の MMP-14 の発現は増加する一方で TIMP-1 と TIMP-2 の発現は減少し, I 型コラーゲンと MMP-13 の発現に刺激の影響は認められなかった。
5. IL-6 または TNF- α の刺激によって成熟脂肪細胞の MMP-13 の発現は減少し, I 型コラーゲン, MMP-14, TIMP-1 および TIMP-2 の発現に刺激の影響は認められなかった。

謝 辞

本研究遂行にあたり，格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部衛生学講座の川戸貴行教授に謹んで感謝申し上げます。また，本研究を通じ多大なるご協力を賜りました同講座の中井久美子助教をはじめ講座の皆様に深く感謝致します。

文 献

1. V. Christiaens, H.R. Lijnen, Angiogenesis and development of adipose tissue, *Mol. Cell Endocrinol.* 318 (2010) 2-9.
2. C. Crewe, Y.A. An, P.E. Scherer, The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis, *J. Clin. Invest.* 127 (2017) 74-82.
3. S. Corvera, O. Gealekman, Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1842 (2014) 463-472.
4. W.B. Lau, K. Ohashi, Y. Wang, H. Ogawa, T. Murohara, X.L. Ma, N. Ouchi, Role of adipokines in cardiovascular disease, *Circ. J.* 81 (2017) 920-928.
5. M.E. Rausch, S. Weisberg, P. Vardhana, D.V. Tortoriello, Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration, *Int. J. Obes.* 32 (2008) 451-463.
6. N. Hosogai, A. Fukuhara, K. Oshima, Y. Miyata, S. Tanaka, K. Segawa, S. Furukawa, Y. Tochino, R. Komuro, M. Matsuda, I. Shimomura, Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation, *Diabetes* 56 (2007) 901-911.
7. K. Lolmede, V. Durand de Saint Front, J. Galitzky, M. Lafontan, A. Bouloumie, Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27 (2003) 1187-1195.
8. G.H. Goossens, A. Bizzarri, N. Venteclef, Y. Essers, J.P. Cleutjens, E. Konings, J.W. Jocken, M. Cajlakovic, V. Ribitsch, K. Clement, E.E. Blaak, Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation, *Circulation* 124 (2011) 67-76.

9. S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, A.W. Ferrante, Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1796-1808.
10. K. Popko, E. Gorska, A. Stelmaszczyk-Emmel, R. Plywaczewski, A. Stoklosa, D. Gorecka, B. Pyrzak, U. Demkow, Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects, *Eur. J. Med. Res.* 15 Suppl 2 (2010) 120-122.
11. M.T. Nurmohamed, M. Heslinga, G.D. Kitas, Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases, *Nat. Rev. Rheumatol.* 11 (2015) 693-704.
12. T. Morita, Y. Yamazaki, C. Fujiharu, T. Ishii, M. Seto, N. Nishinoue, Y. Sasaki, K. Nakai, H. Tanaka, T. Kawato, M. Maeno, Association between the duration of periodontitis and increased cardiometabolic risk factors: a 9-year cohort study, *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 14 (2016) 475-482.
13. J.A.J. Batun-Garrido, M. Salas-Magana, I.E. Juarez-Rojop, Association between leptin and IL-6 concentrations with cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Rheumatol.* 37 (2018) 631-637.
14. R. Gorska, H. Gregorek, J. Kowalski, A. Laskus-Perendyk, M. Syczewska, K. Madalinski, Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis, *J. Clin. Periodontol.* 30 (2003) 1046-1052.
15. S.M. Lobo, B.M. Quinto, L. Oyama, R. Nakamichi, A.B. Ribeiro, M.T. Zanella, M.A. Dalboni, M.C. Batista, TNF- α modulates statin effects on secretion and expression of MCP-1, PAI-1 and adiponectin in 3T3-L1 differentiated adipocytes, *Cytokine* 60 (2012) 150-156.

16. L.J. Ma, S.L. Mao, K.L. Taylor, T. Kanjanabuch, Y. Guan, Y. Zhang, N.J. Brown, L.L. Swift, O.P. McGuinness, D.H. Wasserman, D.E. Vaughan, A.B. Fogo, Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1, *Diabetes* 53 (2004) 336-346.
17. M. Fasshauer, S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Bluher, J. Klein, R. Paschke, Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2003) 1045-1050.
18. K. Nakai, H. Tanaka, K. Yamanaka, Y. Takahashi, F. Murakami, R. Matsuike, J. Sekino, N. Tanabe, T. Morita, Y. Yamazaki, T. Kawato, M. Maeno, Effects of C-reactive protein on the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors via Fcγ receptors on 3T3-L1 adipocytes, *Int. J. Med. Sci.* 14 (2017) 484-493.
19. C. Rodriguez Lanzi, D.J. Perdicaro, M.S. Landa, A. Fontana, A. Antonioli, R.M. Miatello, P.I. Oteiza, M.A. Vazquez Prieto, Grape pomace extract induced beige cells in white adipose tissue from rats and in 3T3-L1 adipocytes, *J. Nutr. Biochem.* 56 (2018) 224-233.
20. D. Park, M. Yoon, Compound K, a novel ginsenoside metabolite, inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells: involvement of angiogenesis and MMPs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422 (2012) 263-267.
21. J.J. Castellot, M.J. Karnovsky, B.M. Spiegelman, Differentiation-dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (1982) 5597-5601.
22. G. Voros, E. Maquoi, D. Demeulemeester, N. Clerx, D. Collen, H.R. Lijnen, Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity, *Endocrinology* 146 (2005) 4545-4554.

23. P. Carmeliet, V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, A. Nagy, Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature* 380 (1996) 435-439.
24. S.J. Bielinski, C. Berardi, P.A. Decker, N.B. Larson, E.J. Bell, J.S. Pankow, M.M. Sale, W. Tang, N.Q. Hanson, C.L. Wassel, M. de Andrade, M.J. Budoff, J.F. Polak, H. Sicotte, M.Y. Tsai, Hepatocyte growth factor demonstrates racial heterogeneity as a biomarker for coronary heart disease, *Heart* 103 (2017) 1185-1193.
25. A. Saiki, F. Watanabe, T. Murano, Y. Miyashita, K. Shirai, Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro, *Int. J. Obes.* 11 (2006) 1676-1684.
26. K. Sun, J. Tordjman, K. Clement, P.E. Scherer, Fibrosis and adipose tissue dysfunction, *Cell. Metab.* 18 (2013) 470-477.
27. J. Li, X. Yu, W. Pan, R.H. Unger, Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (2002) E1334-1341.
28. B. Song, H. Zhang, S. Zhang, Toll like receptor 2 mediates deposition of collagen I in adipose tissue of high fat diet induced obese mice, *Mol. Med. Rep.* 17 (2018) 5958-5963.
29. T. Morita, Y. Yamazaki, M. Seto, T. Yamamoto, K. Nakai, H. Tanaka, M. Ozaki, R. Koshi, M. Maeno, T. Kawato, Effect of periodontitis and toothbrushing frequency on obesity onset: a cohort study, *Med. Sci. Monit.* 25 (2019) 9712-9720.

表および図

Table 1. PCR primers used in the experiments.

Target	Forward primer Reverse primer	Genbank acc no.
<i>Angpt-1</i>	5'-CAATAAGCAGGCAGTTAACATTCTC-3' 5'-CTGTACAATGGGCTGTTCCAA -3'	XM_029469438
<i>Angpt-2</i>	5'-GGACTTCTAAGTGGTGGGCACAG-3' 5'-TGAACATGTAAAGCACCCAAGAG-3'	NM_007426.4
<i>Hgf</i>	5'-TCCATGTGGGACAAGAATATGGAG-3' 5'-CATCATCAGGATTCCGGCAGTA-3'	XM_031380037.1
<i>Vegfa</i>	5'-ACATTGGCTCACTTCCAGAAACAC-3' 5'-TGGTTGGAACCGGCATCTTTA-3'	XM_021150150.2
<i>Mmp-13</i>	5'- TCCCTGGAATTGGCAACAAAG-3' 5'- GCATGACTCTCACAATGCGATTAC -3'	NM_008607.2
<i>Mmp-14</i>	5'- GCAGTGGACAGCGAGTACCCTA-3' 5'- AGTCCCGCAGAGCTGACTTG-3'	XM_021202845.2
<i>Timp-1</i>	5'-CTATAGTGCTGGCTGTGGGGTGTG-3' 5'-TTCCGTGGCAGGCAAGCAAAGT-3'	NM_001044384.1
<i>Timp-2</i>	5'-GGCCTCCCTCCCTTACTCC -3' 5'-GACTTCATATTCCAGCACGCACA-3'	NM_011594.3
<i>Col-1</i>	5'-TCAGTGCAATTGTGTTGCTGAAAG-3' 5'-GATACCAAACCTGGGCGTGCTG-3'	NM_007742.4
<i>36B4</i>	5'- AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3' 5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT -3'	NM_007475

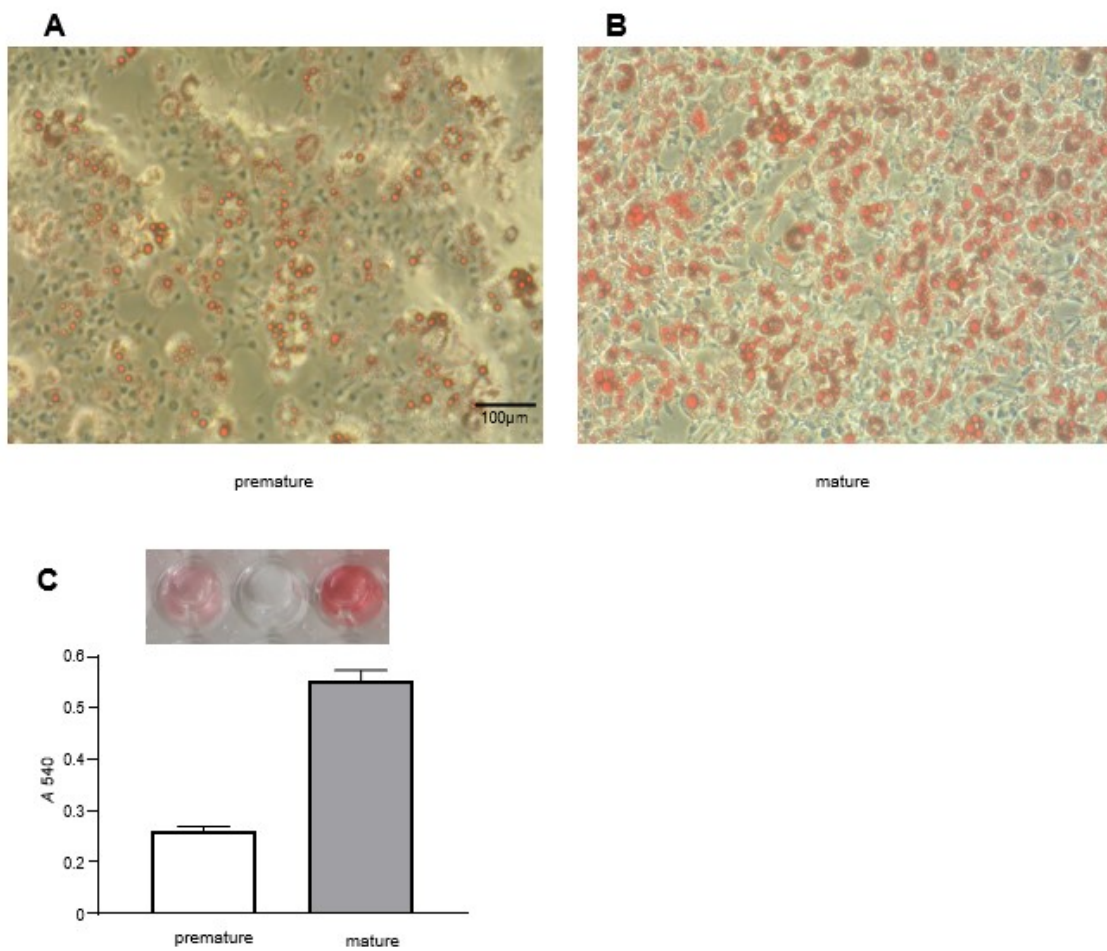


Fig. 1. Cells were stained with Oil Red O. Typical image of premature (A) and mature (B) 3T3-L1 adipocytes. After the extraction of Oil Red O using isopropanol, A_{540} was measured with a microplate reader (C). Reported values are mean \pm standard deviation of triplicate assays.

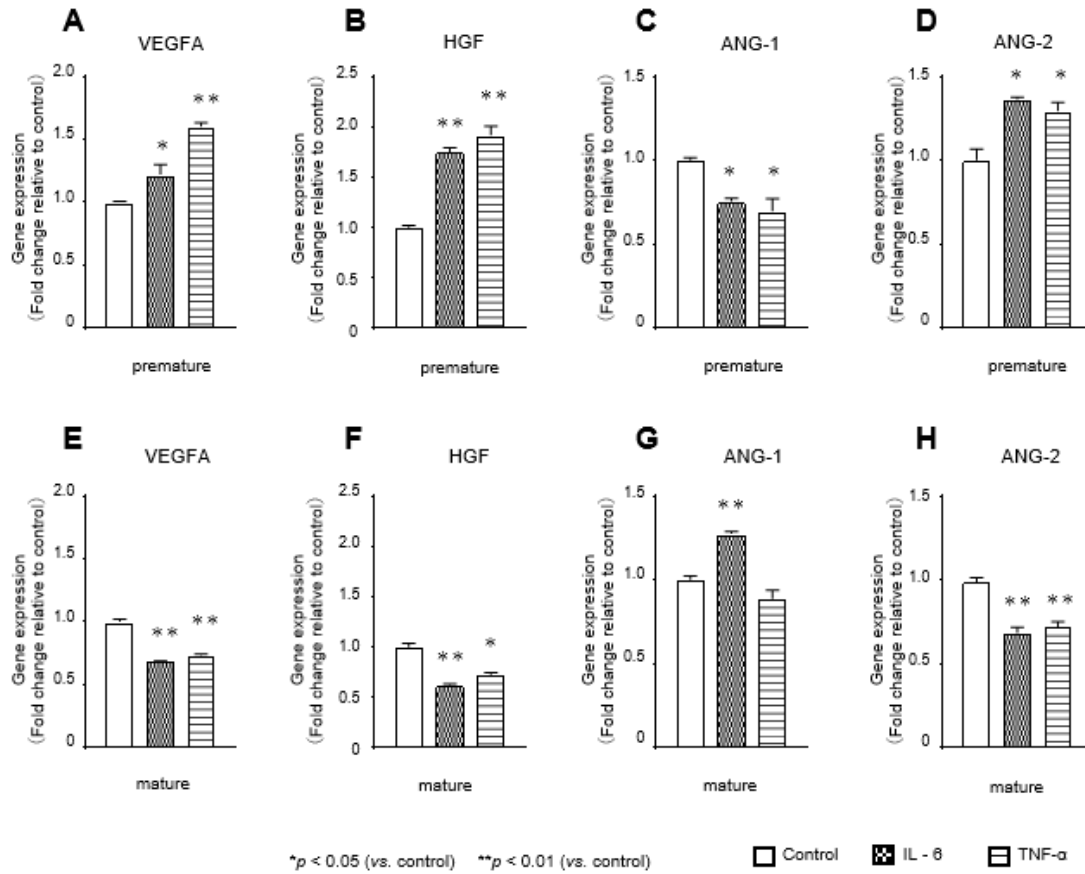


Fig. 2. Effects of IL-6 and TNF- α on the mRNA expression of angiogenic factors in adipocytes. 3T3-L1 cells were induced to differentiate into adipocytes, and premature adipocytes (containing small droplets) or mature adipocytes (containing large droplets) were stimulated with 0.01 ng/mL IL-6 or TNF- α for 12 h. The mRNA expression of four angiogenic factors (A-H) was determined by real-time PCR. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 (versus control).

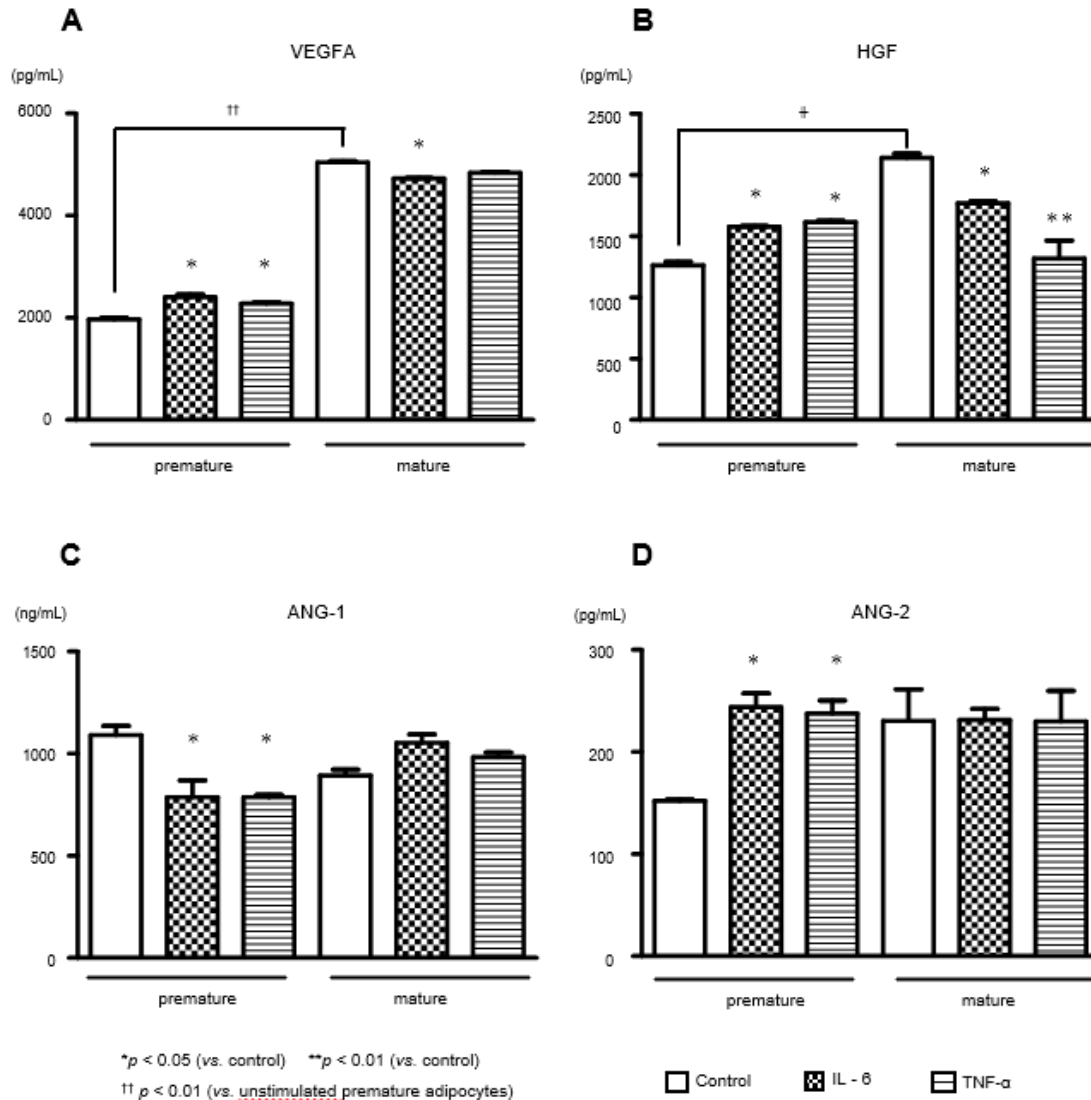


Fig 3: Effects of IL-6 and TNF- α on protein expression of angiogenic factors in adipocytes. 3T3-L1 cells were induced to differentiate into adipocytes, and premature and mature adipocytes were stimulated with 0.01 ng/mL IL-6 or TNF- α for 12 h. The protein expression of four angiogenic factors (A-D) in the culture supernatant was determined by ELISA. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (versus control). †† $p < 0.01$ (versus unstimulated premature adipocytes).

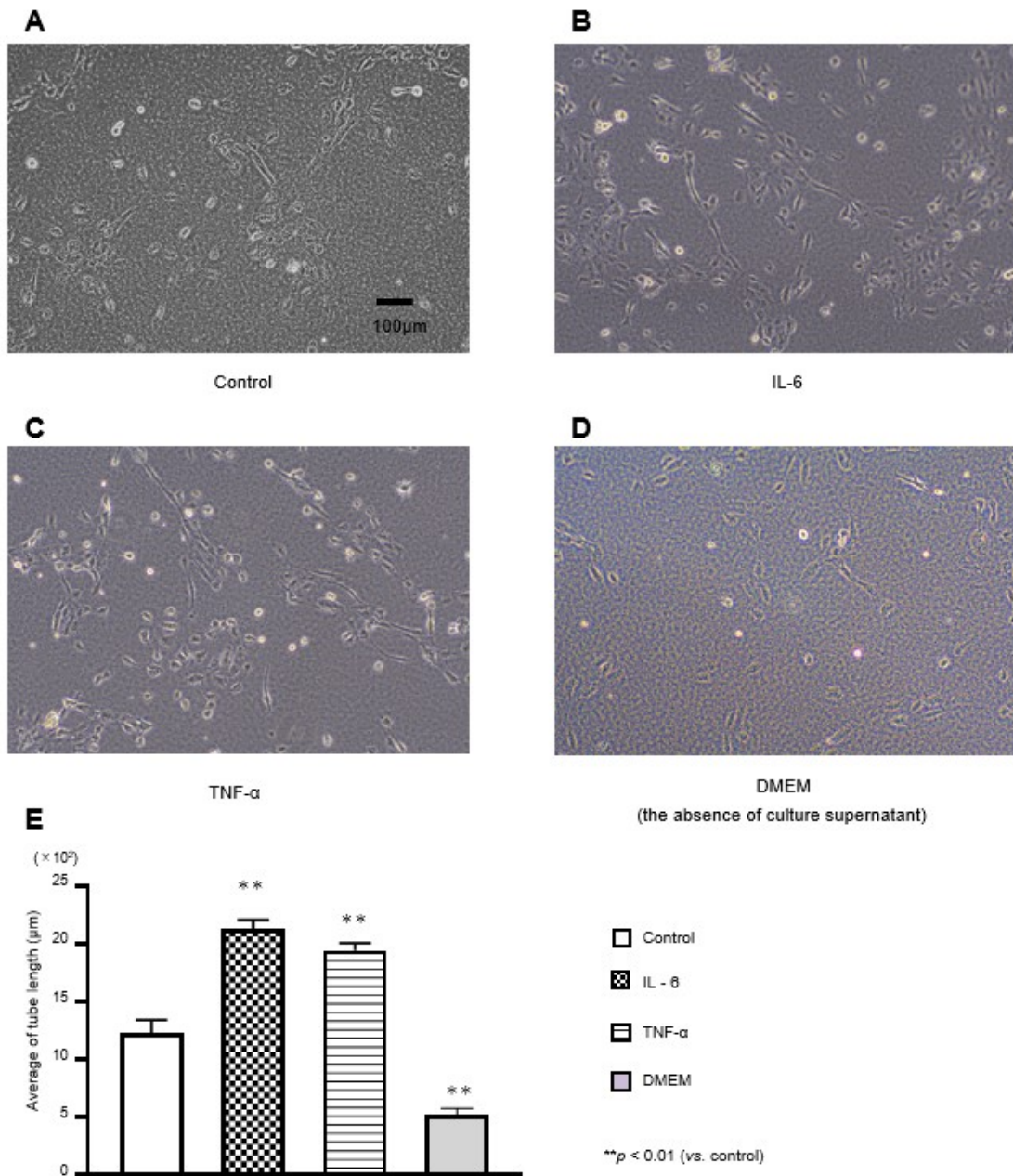


Fig. 4. Effects of premature adipocyte-conditioned medium on tube formation by HUVECs. HUVECs were cultured with added conditioned medium from premature adipocytes that were unstimulated (control) (A), stimulated with IL-6 (B) or TNF- α (C), or without added conditioned medium (D) for 24 h. Average of tube length in ten microscopic fields (E) was calculated, and each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD). **p < 0.01 (versus control).

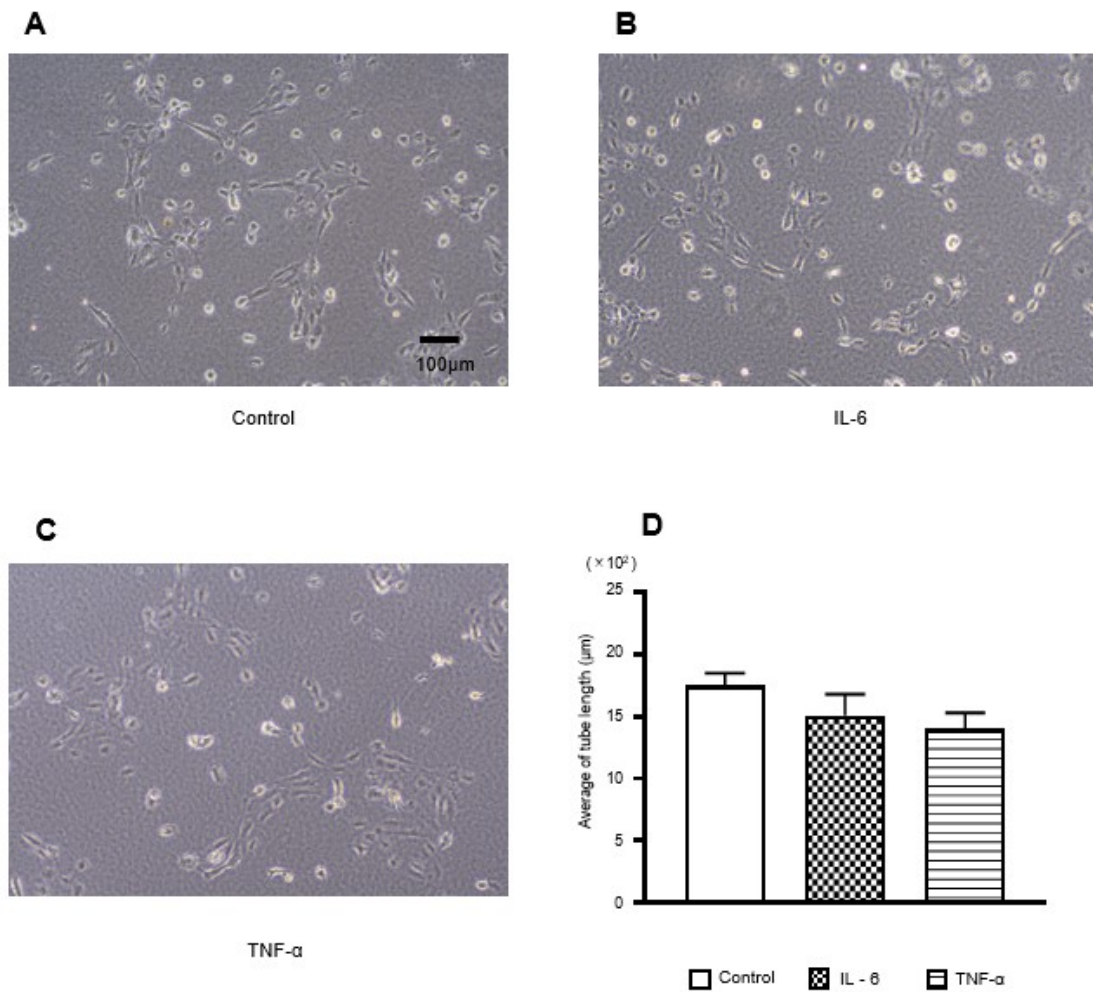


Fig. 5. Effects of mature adipocyte-conditioned medium on tube formation by HUVECs. HUVECs were cultured with conditioned medium from mature adipocytes that were unstimulated (control) (A) or stimulated with IL-6 (B) or TNF- α (C) for 24 h. Average of tube length in ten microscopic fields (D) was calculated, and each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD).

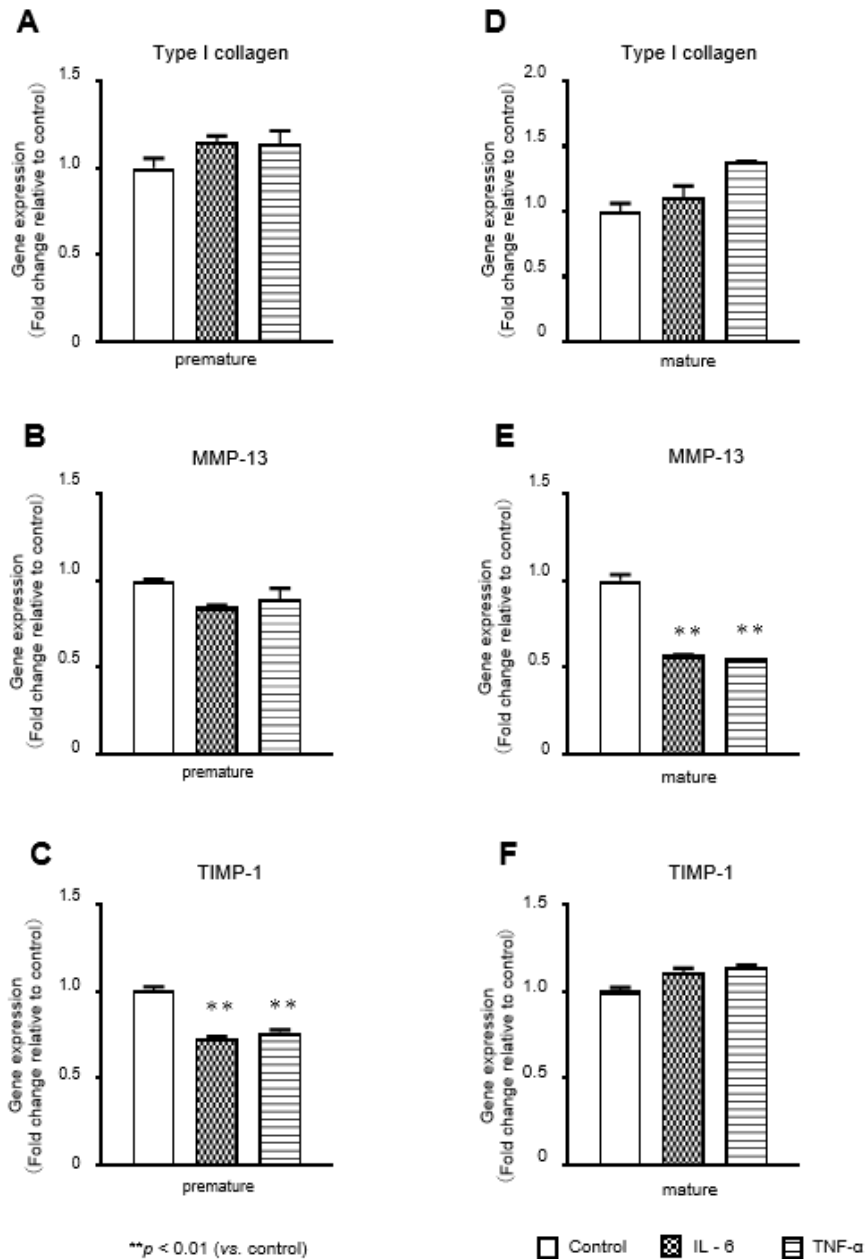


Fig. 6. Effects of IL-6 and TNF- α on mRNA expression of type I collagen, MMP-13, and TIMP-1 in premature and mature adipocytes. 3T3-L1 cells were induced to differentiate into adipocytes and stimulated with 0.01 ng/mL IL-6 or TNF- α for 12 h when premature (A-C) or mature (D-F) adipose was observed, respectively. The mRNA expression of type I collagen, MMP-13, and TIMP-1 was determined by real-time PCR. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. **p < 0.01 (versus control).

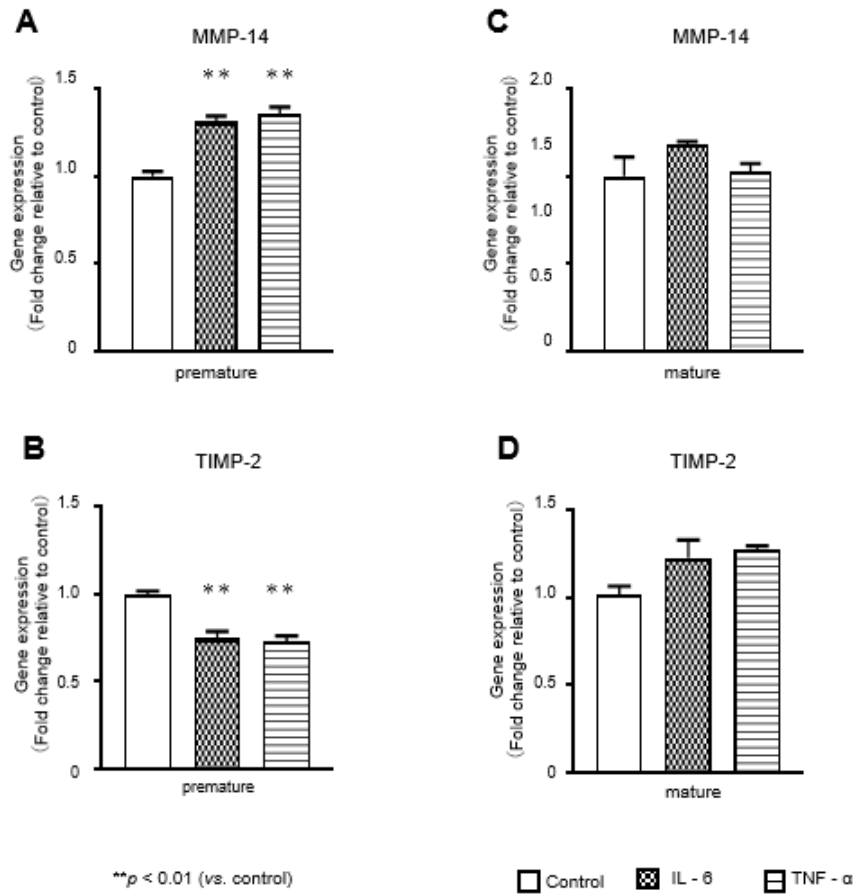


Fig. 7 Effects of IL-6 and TNF- α on mRNA expression of MMP-14 and TIMP-2 in premature and mature adipocytes. 3T3-L1 cells were induced to differentiate into adipocytes and stimulated with 0.01 ng/mL IL-6 or TNF- α for 12 h when premature (A, B) or mature (C, D) adipose was observed, respectively. The mRNA expression of MMP-14 and TIMP-2 was determined by real-time PCR. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. **p < 0.01 (versus control).