

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4862160号  
(P4862160)

(45) 発行日 平成24年1月25日(2012.1.25)

(24) 登録日 平成23年11月18日(2011.11.18)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
G O 1 N	33/15	(2006.01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N 33/50 Z

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2007-528129 (P2007-528129)  
 (86) (22) 出願日 平成18年4月14日 (2006.4.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/307983  
 (87) 国際公開番号 W02006/112418  
 (87) 国際公開日 平成18年10月26日 (2006.10.26)  
 審査請求日 平成21年4月10日 (2009.4.10)  
 (31) 優先権主張番号 特願2005-120421 (P2005-120421)  
 (32) 優先日 平成17年4月18日 (2005.4.18)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 504179255  
 国立大学法人 東京医科歯科大学  
 東京都文京区湯島1-5-45  
 (74) 代理人 100081271  
 弁理士 吉田 芳春  
 (72) 発明者 小川 佳宏  
 東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立  
 大学法人東京医科歯科大学内  
 (72) 発明者 菅波 孝祥  
 東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立  
 大学法人東京医科歯科大学内

審査官 清水 晋治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脂肪細胞とマクロファージの共培養において、被検物質を添加して、脂肪細胞から分泌されるパラクリン因子である遊離脂肪酸及びマクロファージから産生するパラクリン因子であるTNF- $\alpha$ を介した脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の前記被検物質による抑制効果を、該パラクリン因子濃度の変化により測定することを特徴とする、脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質のスクリーニング方法。

【請求項2】

前記パラクリン因子濃度が、遊離脂肪酸の量又は $\omega$ 及びTNF- $\alpha$ の遺伝子発現レベルであることを特徴とする、請求項1に記載のスクリーニング方法。

【請求項3】

前記相互作用の抑制効果には、以下のa乃至cのいずれかの酵素或いは転写因子が関わる細胞内シグナルの阻害効果が含まれることを特徴とする請求項1又は2に記載のスクリーニング方法。

a . M A Pキナーゼキナーゼ1

b . c - j u n N末端キナーゼ

c . 核内因子 B

【請求項4】

前記相互作用の抑制効果を、前記パラクリン因子濃度の変化及び炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの変化により測定することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項

に記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

前記脂肪細胞とマクロファージの共培養が培養液を介した非接触系であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質をスクリーニングするためのスクリーニング系及びそれを用いたスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

10

【0002】

近年、メタボリックシンドロームの分子基盤として全身の軽度の慢性炎症反応が注目され、肥満モデル動物や肥満患者の脂肪組織においてもマクロファージの浸潤が増加することが報告されている。(非特許文献 1)には、脂肪組織に集積したマクロファージは、MCP-1、IL-6、IL-1、TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインを分泌し、更なるマクロファージをリクルートすることが報告されている。また、脂肪組織では多くの炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインが産生されており、体脂肪量の増加における両者のバランスの破綻が、肥満を基盤とするメタボリックシンドロームの発症・進展に關与すると考えられている。

【0003】

20

そのため、炎症性サイトカインの産生を阻害する物質のスクリーニングが行なわれている。しかし、このようなスクリーニング方法で用いるスクリーニング系は、脂肪細胞の炎症性サイトカインの産生を効果的に抑制する物質をスクリーニングすることができなかった。

【0004】

【非特許文献 1】JCI Dec 2003, vol112, 1785-1788

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記従来の状況に鑑み、脂肪細胞の炎症性変化を効果的に抑制する物質をスクリーニングするためのスクリーニング系及びそれを用いたスクリーニング方法を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題を解決するため、本発明者らは、脂肪組織局所における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の分子機構について検討を行なった。その結果、脂肪細胞に由来する遊離脂肪酸がマクロファージにおけるTNF- $\alpha$ 産生を増加し、マクロファージに由来するTNF- $\alpha$ が脂肪細胞における脂肪酸の遊離を増大させ、脂肪組織の炎症反応を増大させることを見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

【0007】

40

本発明は、次の(1)~(5)の構成からなる。

(1) 脂肪細胞とマクロファージの共培養からなる、脂肪細胞の炎症性変化の増加に關与するパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング系。

(2) (1)記載のスクリーニング系において、脂肪細胞とマクロファージの共培養が培養液を介した非接触系であることを特徴とするスクリーニング系。

(3) (1)又は(2)記載のスクリーニング系に被検物質を添加して、前記被検物質によるパラクリン因子、又は炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの変化を測定することを特徴とするパラクリン因子又は細胞内シグナルを阻害する阻害物質のスクリーニング方法。

(4) (3)記載のスクリーニング方法において、パラクリン因子がマクロファージ

50

から産生するTNF- $\alpha$ であることを特徴とするスクリーニング方法。

(5) (3)記載のスクリーニング方法において、パラクリン因子が分化脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0008】

本発明のスクリーニング系は、脂肪細胞とマクロファージの共培養から構成されているので、両方の細胞に相互に作用するパラクリン因子、あるいは細胞内シグナルを阻害する阻害剤をスクリーニングするのに有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

まず、本発明を完成するのに至った知見について説明する。本発明者らは、脂肪組織局所における脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の分子機構について検討を行なった。その結果、脂肪細胞に由来する遊離脂肪酸がマクロファージにおけるTNF- $\alpha$ 産生を増加し、マクロファージに由来するTNF- $\alpha$ が脂肪細胞における脂肪酸の遊離を増大させ、脂肪組織の炎症反応を増大させることを見出した。すなわち、液性因子であるTNF- $\alpha$ や遊離脂肪酸が、パラクリン因子としてそれぞれ脂肪細胞やマクロファージに作用し、脂肪組織の炎症反応を増大させることが明らかとなった。

【0010】

本発明者らは、以上の知見に基づき本発明を完成させた。以下、本発明を実施するための最良の形態について詳細に説明する。

【0011】

(実施例1)

<共培養の作製>

本発明のスクリーニング系として用いるマクロファージ及び脂肪細胞の共培養の作製方法について説明する。まず、マクロファージ(RAW264, RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan)と前駆脂肪細胞(3T3-L1, American Type Culuture Collection, Manassas, VA)を、10%ウシ胎仔血清(Sanko Junyaku, Tokyo, Japan)及び抗生物質を含むDulbecco's Modified Eagle培地中で培養を行なった。培養の条件は、37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  /95% Airとした。

なお、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化は、インスリン(Eli Lilly, Indianapolis, IN)、デキサメタゾン、及び3-イソブチル-1-メチル-キサンチンを用いて行なった。なお、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化の後に、さらに培養を行なうことで肥大化させた脂肪細胞を用いることも可能である。

【0012】

続いて、分化脂肪細胞(分化3T3-L1)とマクロファージ(RAW264, 腹腔内マクロファージ)の共培養を行なう。分化脂肪細胞とマクロファージの共培養は、接触法のものを作製した。接触法の共培養は、図1(A)に示すように、分化3T3-L1をシャーレで培養し、RAW264を分化3T3-L1の上に播種した。そして、これらの細胞は48時間互いに接触した状態で培養された後に採取した。なお、シャーレは直径6cmのものを用いて、分化3T3-L1及びRAW264は各々 $1.5 \times 10^6$ 個/well、 $1.0 \times 10^3 \sim 10^6$ 個用いた。また、対照培養法では、図1(B)に示すように、脂肪細胞とマクロファージとは分離して培養、採取後に混合した。なお、対照培養法においては、脂肪細胞及びマクロファージの数は同数とした。

【0013】

<定量的リアルタイムPCR法>

RNAはAGPC法(Acid guanidinium-Phenol-Chloroform法)により培養した細胞から抽出した。また、定量的リアルタイムPCR法は、ABI Prism 7000 Sequence Detection System using TAQMAN(登録商標) or SYBR(登録商標) Green PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems, foster City, CA)を用いて行なった。

【0014】

<炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの測定>

10

20

30

40

50

続いて、培養液中のMCP-1、TNF- $\alpha$ 、及びアディポネクチンの測定方法について説明する。これら炎症性サイトカイン又は抗炎症性サイトカインを脂肪細胞の炎症性変化の指標として用いた。24時間共培養した後の培養上澄におけるMCP-1、TNF- $\alpha$ 、及びアディポネクチンの定量は、市販の固相酵素免疫検定法 (ELISA, MCP-1 and TNF- $\alpha$ , R&D; アディポネクチン, Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を用いて行なった。

#### 【0015】

分化脂肪細胞 (分化3T3-L1) 及びマクロファージ (RAW264) の共培養を行って、炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの測定を行なった。図2 (A) ~ (C) に示すように、炎症性サイトカインであるMCP-1、IL-6、及びTNF- $\alpha$  が産生された ( $P < 0.01$ )。また、図3に示すように、抗炎症性サイトカインであるアディポネクチンの有意な減少が認められた ( $P < 0.05$ )。そして、図4に示すように、MCP-1及びアディポネクチンの変化量は時間の経過に従って増加した。また、図5に示すように、MCP-1の増加量とアディポネクチンの減少量はRAW264に依存した。

#### 【0016】

##### (実施例2)

非接触法の共培養は、具体的には、図6 (A) に示すように、トランスウェルを用いて、分化脂肪細胞 (分化3T3-L1) 及びマクロファージ (RAW264) とが相互に直接接触することがないように非接触法とした以外は (実施例1) と同様に行なった。具体的には、0.4  $\mu\text{m}$  の孔を有する多孔質膜からなるトランスウェルインサート (Corning, Corning, NY) を用いて、脂肪細胞とマクロファージとを分離して共培養を行なった。そして、24時間培養を行なった後、下層ウェルの分化3T3-L1を採取し、炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの測定を行なった。その結果、図7に示すように、分化3T3-L1におけるMCP-1とIL-6の遺伝子発現を亢進した ( $P < 0.01$ )。また、遺伝子発現亢進の程度は、RAW264の量に依存する結果となった。なお、対照培養法は、図6 (B) に示すように、脂肪細胞とマクロファージとは分離して培養して行なった。

#### 【0017】

以上の結果に示すとおり、分化脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いると、MCP-1の増加が認められ、脂肪細胞の炎症性変化が増大することが分かる。したがって、分化脂肪細胞とマクロファージの共培養系を、脂肪細胞の炎症性変化を阻害する物質、すなわちパラクリン因子の阻害物質のスクリーニングに用いることができる。そして、特に、パラクリン因子は液性物質であり、トランスウェル等を用いた非接触系において、特に脂肪細胞の炎症性変化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

#### 【0018】

続いて、(実施例1) 及び(実施例2) においてマクロファージとして用いたRAW264以外の物質を用いて共培養を作製した場合について説明する。

#### 【0019】

##### (実施例3)

マクロファージとして、RAW264の代わりにGFPトランスジェニックマウスの腹腔内マクロファージを用いた以外は (実施例1) と同様に行なった。なお、マウスの腹腔内マクロファージは、GFPトランスジェニックマウスから5mM 過ヨウ素酸ナトリウムを用いて4日間熟成させることで得た。その結果、腹腔内マクロファージを用いた共培養においては、図8に示すように、RAW264を用いた場合と同様にMCP-1遺伝子発現が認められ ( $P < 0.01$ )、本発明のスクリーニング系に用いることができることがわかった。

#### 【0020】

##### (比較例1)

マクロファージとして、RAW264の代わりにF4/80を用いた以外は (実施例2) と同様に行なった。その結果、F4/80を用いた共培養においては、対照培養法との差は認められなかった。

#### 【0021】

##### (比較例2)

RAW264の代わりに未分化3T3-L1を用いた以外は（実施例1）と同様に行なった。その結果、図8に示すように、未分化3T3-L1を用いた共培養はMCP-1遺伝子発現の増加を殆ど示さないことが分かった。

【0022】

続いて、脂肪細胞の炎症性変化を阻害する物質のスクリーニング方法について説明する。

【0023】

（実施例5）

被検物質として抗TNF- $\alpha$ 中和抗体を3T3-L1とRAW264からなる共培養系に添加した以外は（実施例1）及び（実施例2）と同様に行なった。炎症性サイトカインであるMCP-1の遺伝子発現を測定した結果、図9（A）に示すように、接触法においてMCP-1の遺伝子発現の亢進を効果的に阻害することがわかる（ $P<0.01$ ）。また、図9（B）に示すように、非接触法においてもMCP-1の遺伝子発現の亢進を効果的に阻害することがわかる（ $P<0.01$ ）。したがって、本発明のスクリーニング系は、パラクリン因子であるTNF- $\alpha$ を阻害する物質のスクリーニングに有用であることがわかる。

10

【0024】

（実施例6）

被検物質として細胞内シグナルの一つであるMAPキナーゼを阻害する阻害剤であるMAP kinase kinase 1（MEK1）阻害剤（以下PD98059, Cell Signaling, Berberly, MA）、c-jun amino-terminal kinase（JNK）阻害剤（以下SP600125, BIOMOL, Plymouth Meeting, PA）、あるいは細胞内シグナルの一つである転写因子nuclear factor- $\kappa$ B（NF- $\kappa$ B）を阻害する阻害剤であるNF- $\kappa$ B阻害剤（以下BAY11-7085, Merck, San Diego, CA）を用いて前処理を行なった以外は、（実施例1）と同様に行なった。MCP-1の遺伝子発現を測定した結果、PD98059及びSP600125を用いて前処理することでMCP-1がほとんど増加しないことがわかった（ $P<0.01$ ）。この結果、脂肪細胞の炎症性変化には細胞内シグナルも重要な役割を担っていることがわかった。すなわち、本発明のスクリーニング系は、パラクリン因子を阻害する物質に限らずに、脂肪細胞の炎症性変化に関わるMAPキナーゼやNF- $\kappa$ B等の細胞内シグナルを阻害する物質のスクリーニングにも有用であることがわかる。

20

【0025】

（実施例7）

被検物質としてMAPキナーゼの阻害剤であるPD98059、SP600125、あるいはnuclear factor- $\kappa$ B（NF- $\kappa$ B）の阻害剤であるBAY11-7085を用いて前処理を行なった以外は、（実施例2）と同様にトランスウェルを用いた非接触法において行なった。MCP-1の遺伝子発現を測定した結果、図10に示すように、PD98059又はSP600125の添加により、3T3-L1におけるMCP-1の遺伝子発現の亢進を特に妨げることがわかった。したがって、非接触法の共培養についても、（実施例6）と同様に、パラクリン因子を阻害する物質に限らずに、脂肪細胞の炎症性変化に関わるMAPキナーゼやNF- $\kappa$ B等の細胞内シグナルを阻害する物質のスクリーニングに有用であることがわかる。

30

【0026】

（実施例8）

被検物質として飽和脂肪酸であるパルミチン酸、ラウリン酸を添加した以外は（実施例1）と同様に行なった。炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ の遺伝子発現を測定した結果、図11に示すように、パルミチン酸、ラウリン酸などのような飽和脂肪酸はTNF- $\alpha$ の遺伝子発現を有意に増加させることがわかった（ $P<0.01$ ）。

40

【0027】

（実施例9）

また、被検物質として不飽和脂肪酸であるリノレン酸やエイコサペンタエン酸を添加した以外は（実施例1）と同様に行なった。TNF- $\alpha$ の遺伝子発現を測定した結果、図11に示すように、リノレン酸やエイコサペンタエン酸のような不飽和脂肪酸は、TNF- $\alpha$ の遺伝子発現に影響を与えないことが分かった。

50

## 【 0 0 2 8 】

(実施例 10)

さらに、被検物質として、PD98059、SP600125、あるいはBAY11-7085を用いて前処理を行ない、遊離脂肪酸の量を測定した以外は(実施例1)と同様に行なった。なお、培養液中の遊離脂肪酸の濃度は、acyl-CoAオキシダーゼに基づいたカラーメトリックアッセイキット(NEFA-C; WAKO Pure Chemicals, Osaka, Japan)を用いて行なった。脂肪細胞の炎症性変化を増大させるパラクリン因子であるパルミチン酸の量を測定した結果、PD98059、SP600125、あるいはBAY11-7085の添加によりTNF- $\alpha$ の産生を亢進するパルミチン酸を有意に抑制することがわかった( $P < 0.05$ )。これらの結果は、遊離脂肪酸を分泌する脂肪細胞は少なくとも一部がMAPキナーゼ系を介してマクロファージにおける炎症性変化を増加させることを示している。したがって、本発明のスクリーニング系は、パラクリン因子である遊離脂肪酸を阻害する物質のスクリーニングに限らずに、脂肪細胞の炎症性変化に関わるMAPキナーゼやNF- $\kappa$ B等の細胞内シグナルを阻害する物質のスクリーニングに有用であることがわかる。

10

【産業上の利用可能性】

## 【 0 0 2 9 】

本発明に係るスクリーニング系は、脂肪細胞とマクロファージからなり、脂肪細胞の炎症性変化を起こすものであり、被検物質を加えることで被検物質が脂肪細胞の炎症性変化に与える影響を調べることができる。したがって、このスクリーニング系は、脂肪細胞の炎症性変化に関わる物質の探索や、脂肪細胞の炎症性変化を抑制する物質のスクリーニングに利用することができる。

20

【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 3 0 】

【図1】脂肪細胞(3T3-L1)とマクロファージ(RAW264)の(A)共培養(接触法)、及び(B)対照培養法を示す図である。

【図2】対照培養と共培養(接触法)における(A)MCP-1、(B)IL-6、(C)TNF- $\alpha$ の遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図3】対照培養と共培養(接触法)におけるアディポネクチンの遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図4】対照培養と共培養(接触法)におけるMCP-1とアディポネクチンの遺伝子発現レベルを測定した結果である。

30

【図5】マクロファージ(RAW264)の細胞数に対する、対照培養法と共培養(接触法)におけるMCP-1とアディポネクチンの遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図6】脂肪細胞(3T3-L1)とマクロファージ(RAW264)の(A)共培養(非接触法)、及び(B)対照培養法を示す図である。

【図7】対照培養と共培養(非接触法)における(A)MCP-1、(B)IL-6の遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図8】未分化3T3-L1, RAW264, 及び腹腔内マクロファージを用いた共培養(接触法)におけるMCP-1遺伝子発現レベルを測定した結果である。

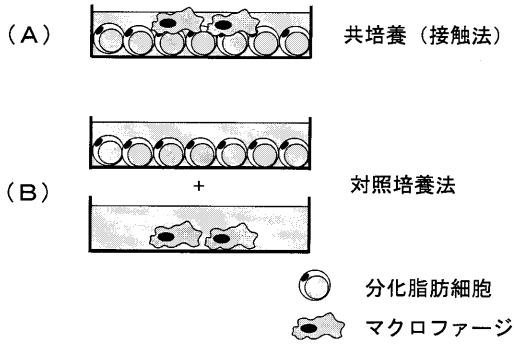
【図9】(A)接触法及び(B)非接触法の共培養系において対照IgG(1  $\mu$ g/ml)又は抗TNF- $\alpha$ 抗体(1  $\mu$ g/ml)を添加した際のMCP-1遺伝子発現レベルを測定した結果である。

40

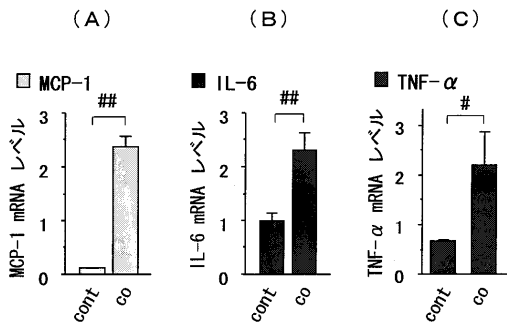
【図10】非接触法の共培養系においてPD98059(20  $\mu$ mol/l)又はSP600125(10  $\mu$ mol/l)を添加した際のMCP-1遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図11】非接触法の共培養系においてパルミチン酸(50-500  $\mu$ mol/l)、ラウリル酸(500  $\mu$ mol/l)、リノレイン酸(500  $\mu$ mol/l)、又はエイコサペンタエン酸(50  $\mu$ mol/l)を添加した際のTNF- $\alpha$ 遺伝子発現レベルを測定した結果である。

【図1】



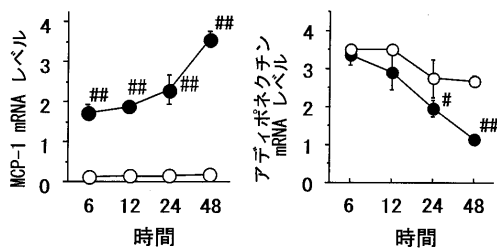
【図2】



cont: 対照培養法  
co: 共培養法

#P < 0.05, ##P < 0.01  
n = 8

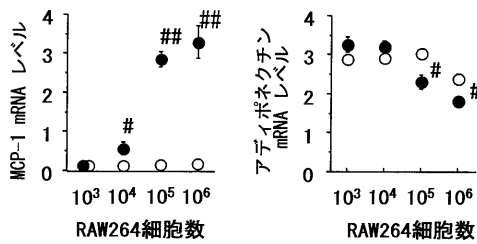
【図4】



○: 対照培養法  
●: 共培養 (接触法)

#P < 0.05, ##P < 0.01 vs. 対照培養法  
n = 8

【図5】

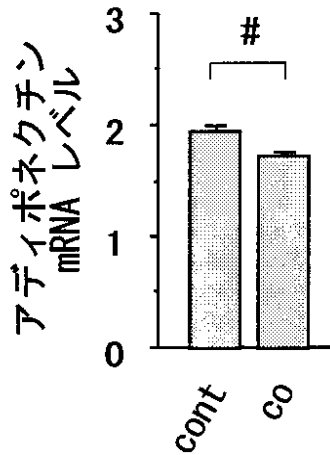


○: 対照培養法  
●: 共培養 (接触法)

#P < 0.05, ##P < 0.01 vs. 対照培養法  
n = 8

【図3】

Adiponectin

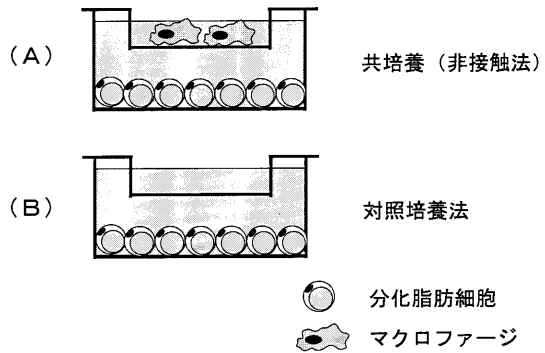


cont: 対照培養法  
co: 共培養法

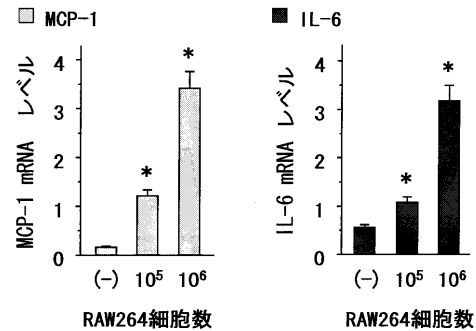
#P < 0.05

n = 8

【図6】

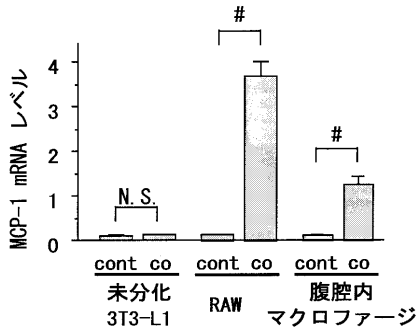


【図7】



\*P < 0.01  
n = 4

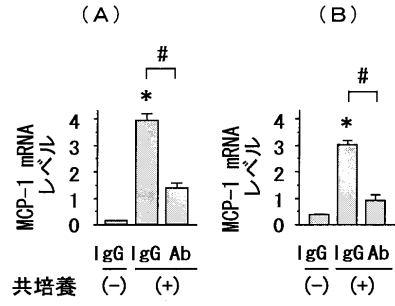
【 図 8 】



cont: 対照培養法  
co: 共培養 (接触法)

#P < 0.01  
n = 4

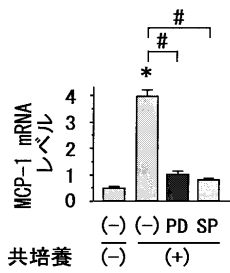
【 図 9 】



IgG: 対照IgG 1 μg/ml  
Ab: 抗TNF-α中和抗体 1 μg/ml

\*P < 0.01 vs. 共培養(-)  
n = 8

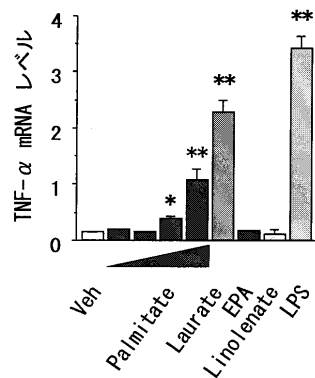
【 図 10 】



PD: PD98059 20 μmol/l  
SP: SP600125 10 μmol/l

\*P < 0.01 vs. 共培養(-)  
#P < 0.01  
n = 8

【 図 11 】



Veh: vehicle  
Palmitate 50-500 μmol/l  
Laurate 500 μmol/l  
EPA: eicosapentaenoic acid 50 μmol/l  
Linolenate 500 μmol/l

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. Veh  
n = 8



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 The Journal of clinical investigation. 2003, Vol.112, No.12, p.1796-1808  
Annals of the New York Academy of Sciences. 1999, Vol.892, p.146-154  
今堀和友、外1名 監, 生化学辞典(第3版), 東京化学同人, 1998年10月8日, 第3版, p.371(共存培養の項目)  
Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005 Oct, Vol.25, No.10, p.2062-2068

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00  
C12N 15/00-15/90  
C07K 14/00-19/00  
PubMed  
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)