



原著

OLETF ラットの精巣上体脂肪と肝臓における 炎症性サイトカイン発現の経時的変化

高石 果歩¹, 大島 勇哉¹, 後藤 夏季², 藤田 直人^{1*}, 浦川 将¹

1. 広島大学大学院医系科学研究科運動器機能医科学
2. 宮崎大学医学部附属病院 リハビリテーション部

要旨

【背景/目的】2型糖尿病の病期に応じた運動処方を検討する前段階として、肥満と耐糖能障害の進行に合わせた、精巣上体脂肪組織と肝臓に由来する炎症性サイトカインの発現量の推移を検証した。

【方法】肥満を伴う2型糖尿病モデル動物である雄性 OLETF ラット、及び非肥満モデル動物として雄性 LETO ラットを使用し、8 週齢、20 週齢、30 週齢、60 週齢において、精巣上体脂肪組織と肝臓に由来するサイトカイン (IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-10) の mRNA 発現量を測定した。

【結果】8 週齢から 30 週齢にかけて、OLETF ラットの精巣上体脂肪量と肝臓トリグリセリド量は LETO ラットと比較して有意に高値を示したが、60 週齢では有意に低値を示した。また、OLETF ラットにおける耐糖能障害は 8 週齢の時点から確認され、その後は悪化し続けた。OLETF ラットの精巣上体脂肪組織に由来する IL-6 の発現量は、20 週齢から 30 週齢にかけて有意に増加し、その後は有意に減少した。一方、OLETF ラットの肝臓における TNF α の発現量は、8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加し、その後は有意に減少した。

【考察】内臓脂肪や異所性脂肪の過剰な蓄積が、2 型糖尿病の病期の初期において耐糖能障害を引き起こし、肥満の進行により肝臓由来の TNF α と脂肪由来の IL-6 が耐糖能障害を促進させることが示唆された。

責任著者連絡先:

藤田直人
広島大学大学院医系科学研究科運動器機能医科学
〒734-8553 広島県広島市南区霞 1-2-3
E-mail: fujitan@hiroshima-u.ac.jp

キーワード:

炎症性サイトカイン, 肥満 2 型糖尿病, 脂肪組織

初回投稿受付日: 2021 年 11 月 29 日

採択日: 2022 年 1 月 6 日

はじめに

肥満では、内臓脂肪量の増加に伴う脂肪細胞の肥大が慢性化することにより、脂肪組織に由来する炎症性サイトカインの発現が生じる¹⁾。過剰に肥大した脂肪細胞から分泌される炎症性サイトカインや

脂肪酸は肝臓や骨格筋などにインスリン抵抗性を誘導すると共に、異所性脂肪として蓄積される²⁾。脂肪組織と同様に、肝臓における異所性脂肪の過剰な蓄積も慢性炎症を誘発する。この様に、慢性炎症を呈する脂肪組織や肝臓から分泌される炎症

性サイトカインは、インスリン抵抗性、更には 2 型糖尿病の誘因になると考えられる。

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットは、コレシストキニン A 受容体の遺伝子変異に伴う過食によって肥満と 2 型糖尿病を自然発症するモデル動物である³⁾。OLETF ラットは 4 週齢から体重が顕著に増加し始め、5 週齢時点で非肥満動物の Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットと比較して体重は有意に高値となる⁴⁾。脂質異常症は 6 週齢頃から、耐糖能障害は 8 週齢頃から生じる⁴⁾。OLETF ラットは 25 週齢までには糖尿病を発症し、40 週齢頃から低インスリン血症を呈し、体重は徐々に減少する³⁾。また、OLETF ラットは 20 週齢頃から腎症を発症し³⁾、40 週齢までに非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) が進行する⁵⁾。このように、OLETF ラットの自然史はヒトの 2 型糖尿病の経過に極めて類似している。

OLETF ラットにおける耐糖能障害の経時的な推移はこれまでに報告されているが、各々の病期における脂肪組織や異所性脂肪に由来する炎症性サイトカイン発現量の推移は不明である。肥満において炎症性サイトカインが高発現した際、脂肪組織には細胞死に陥った脂肪細胞を、遊走して来た貪食細胞が取り囲むような組織像を呈する crown-like structure (CLS) が確認されており⁶⁾、齧歯類の肥満モデルでは精巣上体脂肪を主として CLS の形成と慢性炎症の関係性が報告されている⁷⁾。また、過栄養に伴う異所性脂肪の増加は肝臓で主として確認されており、慢性炎症によってインスリン抵抗性などの健康障害が引き起こされる⁸⁾。運動は、炎症性サイトカインの発現量の増加に関与する内臓脂肪の過剰蓄積や肝臓における異所性脂肪の増加を抑制する効果がある⁹⁾。脂肪組織に生じる CLS や肝臓における異所性脂肪の増加を指標として、肥満 2 型糖尿病の各病期における炎症性サイトカインの発現量との関係性を明らかにすることで、各々の病

期における治療ターゲットを明確にできれば、運動を含む治療プロトコルを確立する上で臨床応用が可能になると考えられる。本研究では、OLETF ラットに生じる耐糖能障害の病期を基準に、精巣上体脂肪と肝臓における脂肪量とサイトカイン発現量の推移を検討した。

方法

1. 実験動物

肥満に伴う 2 型糖尿病モデル動物として雄性 OLETF ラット (n = 22) を用い、非肥満動物として雄性 LETO ラット (n = 17) を用いた (株式会社星野試験動物飼育所)。OLETF ラット、LETO ラットともに、8 週齢 (OLETF n = 6, LETO n = 6)、20 週齢 (OLETF n = 6, LETO n = 5)、30 週齢 (OLETF n = 6, LETO n = 3)、60 週齢 (OLETF n = 4, LETO n = 3) において経口ブドウ糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test: OGTT) を実施した 2 日後、12 時間の絶食を経て、ペントバルビタールの腹腔内大量投与にて安楽死させた。その後、精巣上体脂肪と肝臓を摘出し、湿重量を測定した上で、4% パラホルムアルデヒドで固定、もしくは液体窒素で急速凍結させた後に -80°C で保存した。

飼育環境について、同一系統のラットを 1 ケージに 3 匹飼育し、12 時間の明暗サイクル、及び 22 ± 2°C の一定温度を設定した。餌 (MF, Oriental Yeast, Japan; 水分 7.9%, 粗タンパク質 23.1%, 粗脂肪 5.1%, 粗灰分 5.8%, 粗繊維 2.8%, 可溶性無窒素物 55.3%) と水は自由摂取とした。全ての実験は広島大学における動物実験に関する指針に従い、動物実験委員会の承認を受けた上で実施した (A16-5)。

2. 経口ブドウ糖負荷試験

OGTT はラットを 12 時間絶食とした上で実施した。空腹時、ブドウ糖 (2 g/kg) 負荷 30 分後、60 分後、

120 分後の 4 時点で外側尾静脈から採血を行い、吸光光度法にて血糖値 (298-65701, Wako, Japan) を測定した。また、遠心分離後の血清を用いて、ELISA 法にてインスリン値 (M1101, Morinaga, Japan) を測定した。なお、OGTT における血糖値とインスリン値に関しては曲線下面積として算出した。

3. 脂肪組織と肝臓におけるサイトカインの発現量解析

凍結保存した脂肪組織と肝臓から TRIzol (15596-026, Invitrogen, Japan) を用いて total RNA を抽出した。cDNA に逆転写した後、TaqMan を用いたリアルタイム PCR 法にて、Interleukin-6 (IL-6) (Rn01410330_ml), Interleukin-1 β (IL-1 β) (Rn00580432_ml), Tumor necrosis factor α (TNF α) (Rn01525859_gl), Interleukin-10 (IL-10) (Rn00563409_ml) の mRNA の発現量を測定した。ハウスキーピング遺伝子として 18S (Rn03928990_gl) rRNA を用い、両系統の各週齢における mRNA の発現量を、LETO ラットの 8 週齢に対する相対値として算出した。

4. 組織学的解析

脂肪組織はパラフィン包埋して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて組織学的観察を行った。また、肝臓の凍結切片を作製し、Oil Red O 染色にて中性脂肪の局在を可視化した。加えて、肝臓の脂肪含有量を測定するため、Folch 法にて肝臓サンプルの全脂質を抽出し、吸光光度法にてトリグリセリド量 (294-63601, Wako, Japan) を測定した。

5. 統計処理

全ての測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。両系統、及び各週齢の比較には 2 元配置分散分析と Bonferroni の多重比較検定を用いた。統計解析には SPSS (IBM SPSS Statistics version 19.0, IBM

Japan, Japan) を用い、全ての統計処理に関して、有意水準は 5% とした。

結果

1. 体重

LETO ラットの体重は 8 週齢から 60 週齢にかけて増加し続けた (図 1A)。一方、OLETF ラットの体重は 8 週齢から 30 週齢にかけて増加し、30 週齢から 60 週齢にかけて減少した。8 週齢から 30 週齢における OLETF ラットの体重は LETO ラットと比較して有意に高値を示していたが、60 週齢では有意に低値を示した。

LETO ラットの餌摂取量は全ての週齢間に有意差を認めなかった (図 1B)。OLETF ラットの餌摂取量は 30 週齢から 60 週齢にかけて有意に増加した。また、全ての週齢において、OLETF ラットの餌摂取量は LETO ラットと比較して有意に高値を示した。

2. 血糖値とインスリン値

8 週齢の OGTT における血糖値に関して、空腹時、グルコース投与後 30 分、60 分において OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に高値を示した (図 2A)。20 週齢では、空腹時血糖値において OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に高い傾向を認め ($p=0.05$)、グルコース投与後 30 分、60 分、120 分において OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に高値を示した (図 2B)。30 週齢と 60 週齢では、20 週齢と同様に、全ての週齢において OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に高値を示した (図 2C, D)。また、LETO ラットの空腹時血糖値と血糖値の曲線下面積は全ての週齢間に有意差を認めなかった (図 2E, F)。一方、OLETF ラットの空腹時血糖値は 8 週齢から 60 週齢にかけて増加傾向にあった。OLETF ラットの血糖値の曲線下面積は 8 週齢から 60 週齢にかけて有意に増加し続け、また、全ての週齢において、OLETF ラットは

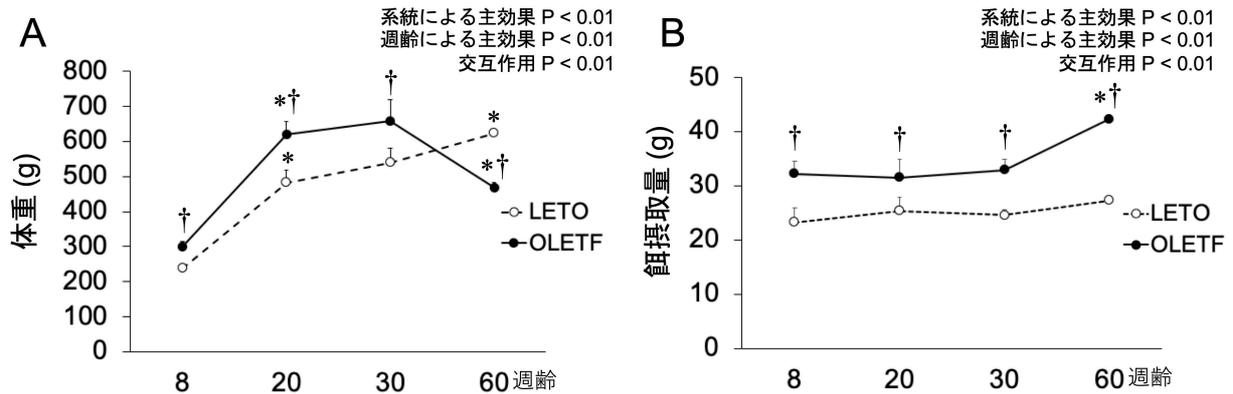


図 1. 体重の推移

A 体重の推移. B 餌摂取量の推移.

* 同一系統における 1 時点前の週齢に対する有意差 ($p < 0.05$)

† 同一週齢の LETO ラットに対する有意差 ($p < 0.05$)

測定値は平均値±標準偏差で示した.

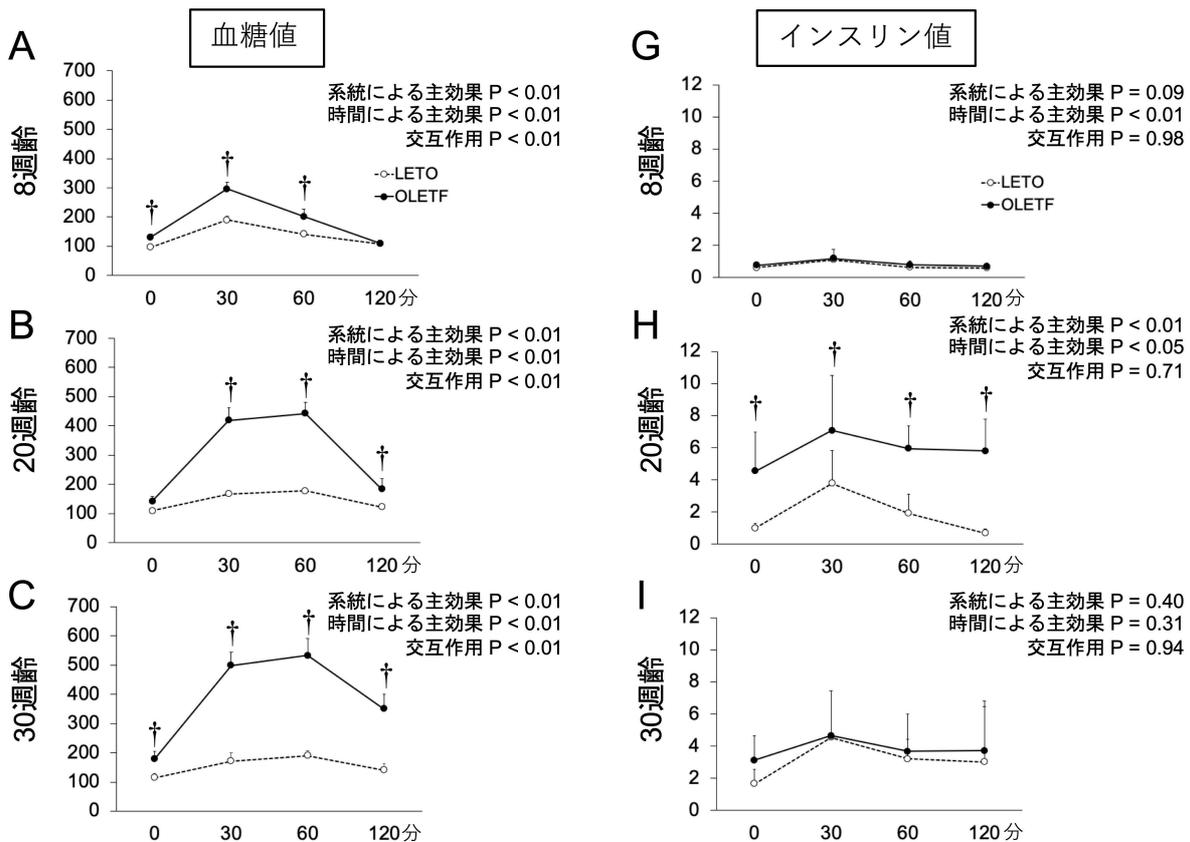


図 2. 血糖値とインスリン値

(次ページへ続く)

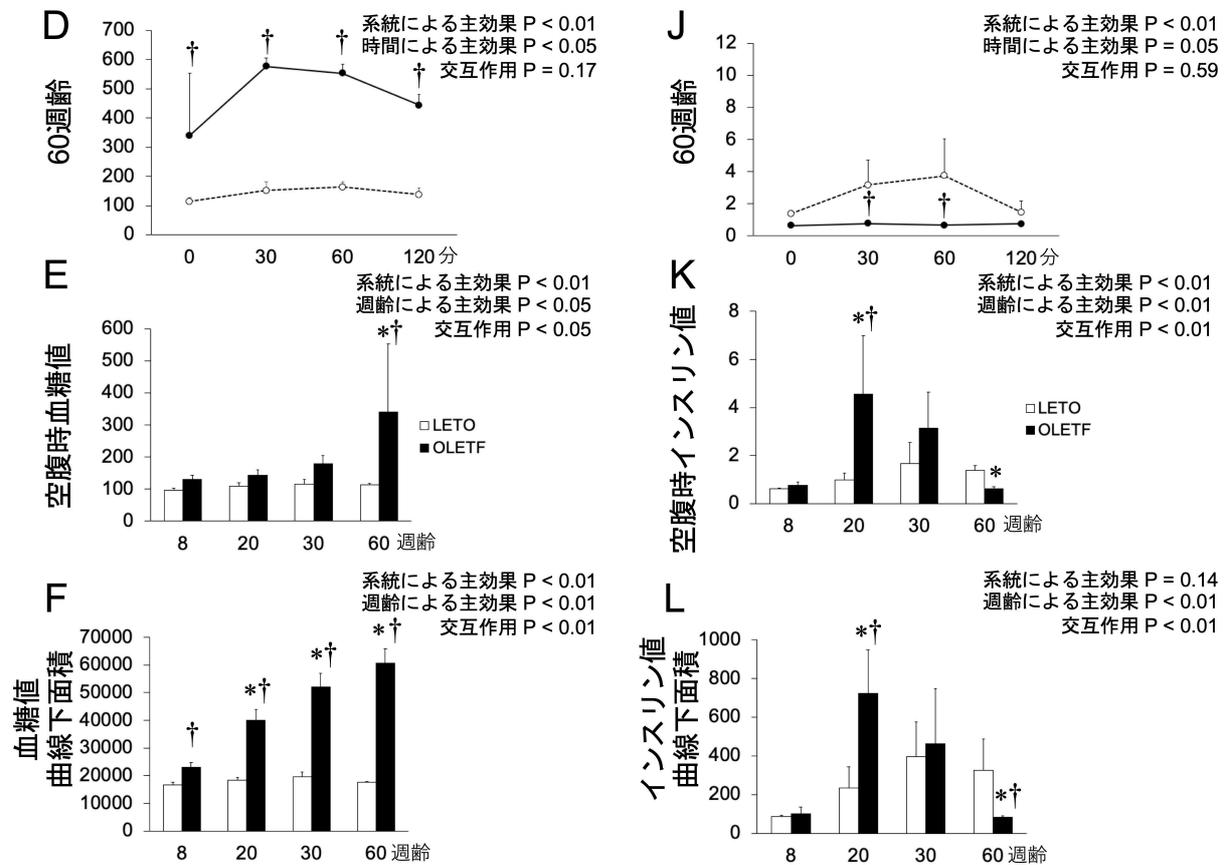


図2. 血糖値とインスリン値

A-D 8週齢から60週齢のOGTTにおける血糖値. E 空腹時血糖値の推移. F OGTTにおける血糖値の曲線下面積. G-J 8週齢から60週齢のOGTTにおけるインスリン値. K 空腹時インスリン値の推移. L OGTTにおけるインスリン値の曲線下面積.

* 同一系統における1時点前の週齢に対する有意差 ($p < 0.05$)

† 同一週齢のLETOラットに対する有意差 ($p < 0.05$)

測定値は平均値±標準偏差で示した.

LETOラットと比較して有意に高値を示した.

OGTTにおけるインスリン値に関して、8週齢ではLETOラットとOLETFラットとの間に有意差を認めなかった(図2G). 20週齢では空腹時、グルコース投与後30分、60分、120分においてOLETFラットはLETOラットと比較して有意に高値を示した(図2H). 30週齢ではLETOラットとOLETFラットとの間に有意差を認めなかった(図2I). 60週齢ではグ

ルコース投与後30分、60分においてOLETFラットはLETOラットに比べて有意に低値を示した(図2J). また、LETOラットの空腹時インスリン値とインスリン値の曲線下面積は全ての週齢間に有意差を認めなかった(図2K, L). OLETFラットの空腹時インスリン値とインスリン値の曲線下面積は8週齢から20週齢にかけて有意に増加し、20週齢から30週齢にかけて減少を経て、30週齢から60週齢にか

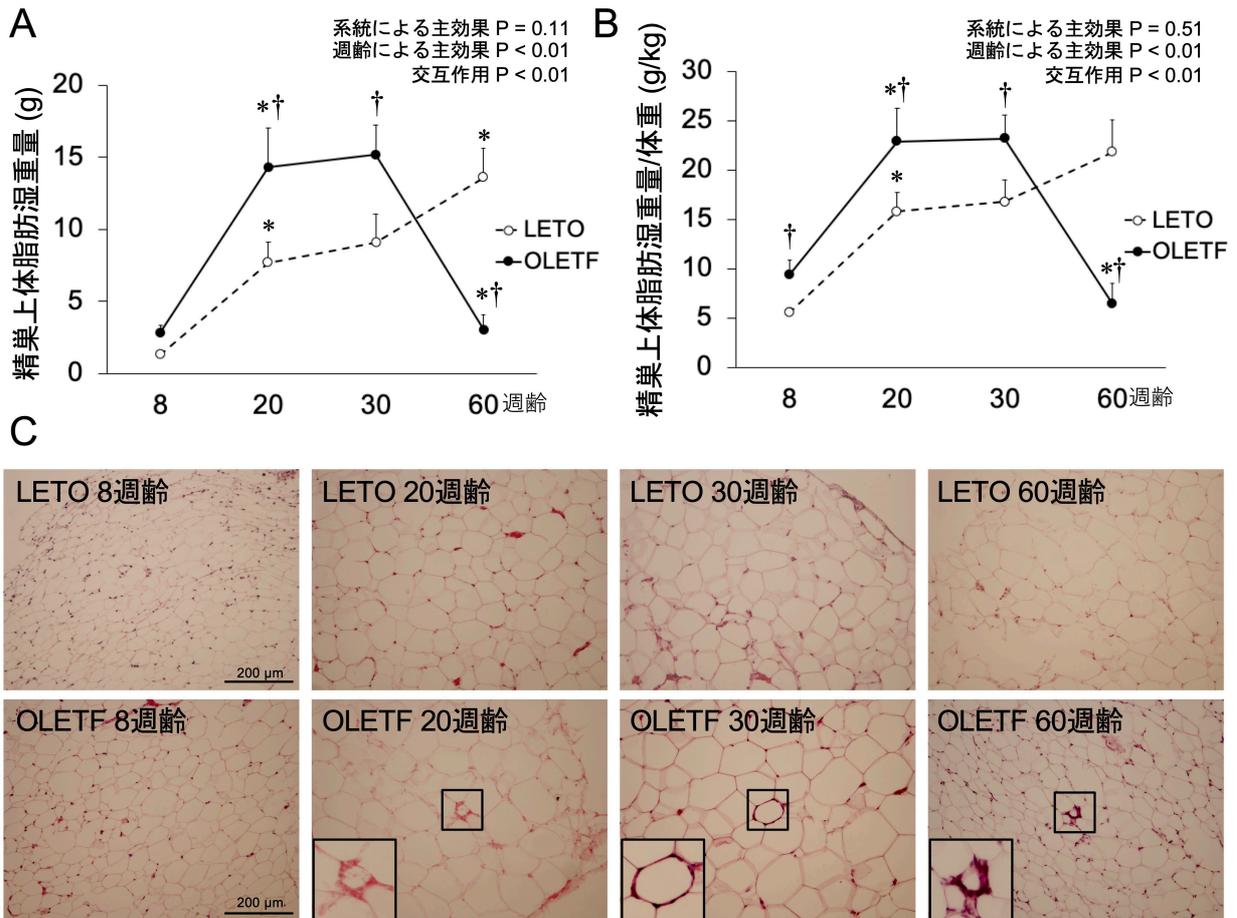


図 3. 精巣上体脂肪の組織学的所見

A 精巣上体脂肪湿重量. B 体重に占める精巣上体脂肪重量. C 精巣上体脂肪のヘマトキシリン・エオジン染色の代表所見. 脂肪細胞の周囲にヘマトキシリン濃染部分を認める構造を CLS 所見とし, CLS はワイプで示した.

* 同一系統における 1 時点前の週齢に対する有意差 ($p < 0.05$). † 同一週齢の LETO ラットに対する有意差 ($p < 0.05$)
測定値は平均値±標準偏差で示した.

けて有意に減少した. また, 空腹時インスリン値に関して, 20 週齢において, OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に高値を示した. インスリン値の曲線下面積に関して, 8 週齢と 30 週齢では両系統間に有意差を認めなかったが, 20 週齢では OLETF ラットが LETO ラットと比較して有意に高値を示し, 60 週齢では OLETF ラットが LETO ラットと比較して有意に低値を示した.

3. 精巣上体脂肪

3.1. 精巣上体脂肪の組織学的所見

LETO ラットの精巣上体脂肪量は, 8 週齢から 20 週齢, 及び 30 週齢から 60 週齢にかけて有意に増加した(図 3A). OLETF ラットの精巣上体脂肪量は, 8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加した. 一方, 30 週齢から 60 週齢にかけて有意に減少した. また, 20 週齢, 30 週齢において, OLETF ラットの精巣上体脂肪量は LETO ラットと比較して有意に高値を示

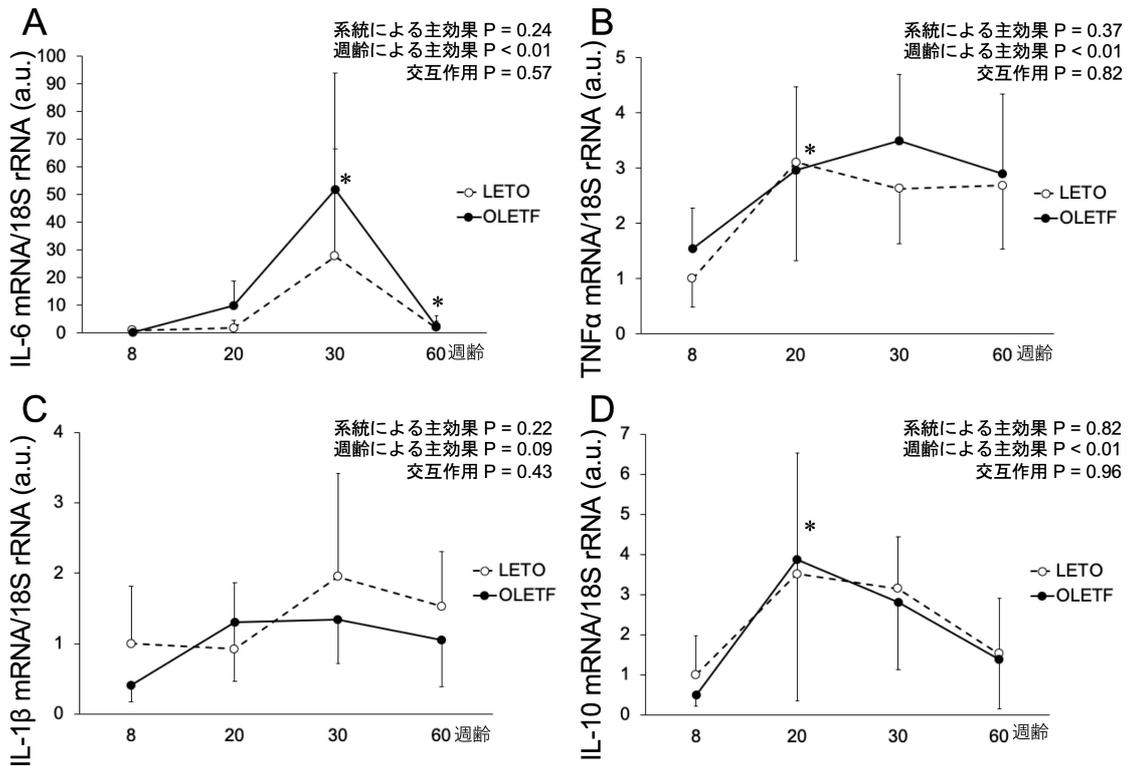


図 4. 精巣上体脂肪における各種サイトカインの mRNA 発現量

A IL-6 mRNA 発現量. B TNFα mRNA 発現量. C IL-1β mRNA 発現量. D IL-10 mRNA 発現量.

* 同一系統における 1 時点前の週齢に対する有意差 ($p < 0.05$)

測定値は平均値±標準偏差で示した.

した. 一方, 60 週齢において, OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に低値を示した.

LETO ラットの体重に占める精巣上体脂肪量は, 8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加し, 以降は緩やかに増加した(図 3B). OLETF ラットの体重に占める精巣上体脂肪量は, 8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加した. 一方, 30 週齢から 60 週齢にかけて有意に減少した. 8 週齢, 20 週齢, 30 週齢において, OLETF ラットの体重に占める精巣上体脂肪量は LETO ラットと比較して有意に高値を示した. 一方, 60 週齢において, OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に低値を示した.

精巣上体脂肪の組織学的所見に関して, LETO

ラットの全週齢, 並びに OLETF ラットの 8 週齢において, CLS は認めなかった(図 3C). 一方, OLETF ラットの 20 週齢以降は CLS を認めた. また, 60 週齢の OLETF ラットでは, 多くの脂肪細胞が縮小したにもかかわらず CLS が確認され, 脂肪細胞のサイズには大小不同が観察された.

3.2. 精巣上体脂肪組織に由来するサイトカイン発現量の推移

IL-6 に関して, LETO ラットでは 30 週齢が高値であるものの, 全ての週齢間に有意差を認めなかった(図 4A). OLETF ラットでは 20 週齢から 30 週齢にかけて有意に増加した. また, 30 週齢から 60 週齢

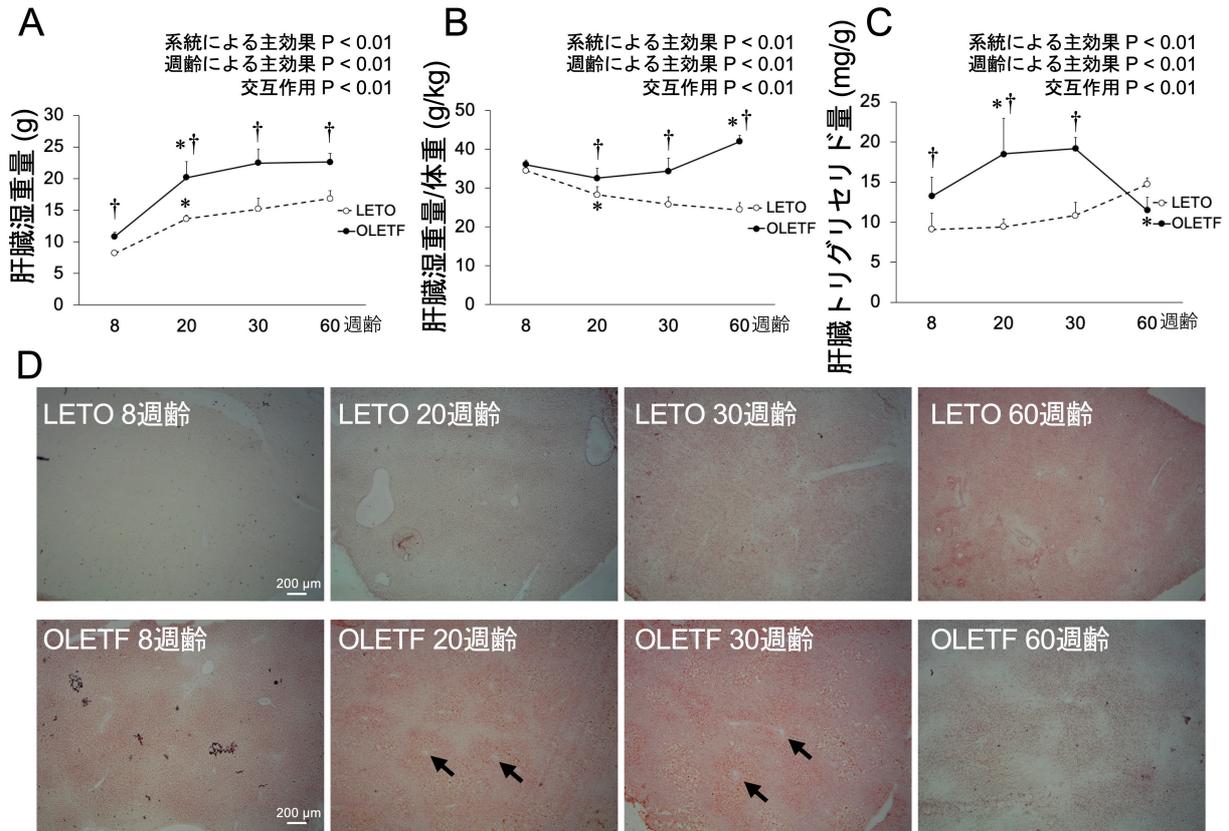


図 5. 肝臓の組織学的所見

A 肝臓湿重量. B 体重に占める肝臓重量. C 肝臓のトリグリセリド含有量. D Oil Red O 染色の代表所見.

赤色に濃染されている部位を中性脂肪の陽性反応とし、それらは中心静脈(矢印)から放射状に広がり、斑状に存在した.

* 同一系統における 1 時点前の週齢に対する有意差 ($p < 0.05$)

† 同一週齢の LETO ラットに対する有意差 ($p < 0.05$)

測定値は平均値±標準偏差で示した.

にかけて有意に減少した.

TNF α に関して、LETO ラットでは 8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加した(図 4B). OLETF ラットでも同様に 8 週齢から 30 週齢にかけて増加し、それ以降は減少したが、全ての週齢間に有意差を認めなかった.

IL-1 β に関して、両系統とも、全ての週齢間に有意差を認めなかった(図 4C).

IL-10 に関して、LETO ラットでは 20 週齢が高値であるものの、全ての週齢間に有意差を認めな

かった(図 4D). OLETF ラットでは 8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加し、20 週齢以降は低下した.

4. 肝臓

4.1. 肝臓の組織学的所見

LETO ラットの肝臓湿重量は 8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加した(図 5A). OLETF ラットの肝臓湿重量は 8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加した. また、8 週齢から 60 週齢にかけて OLETF ラットの肝臓湿重量は LETO ラットと比較し

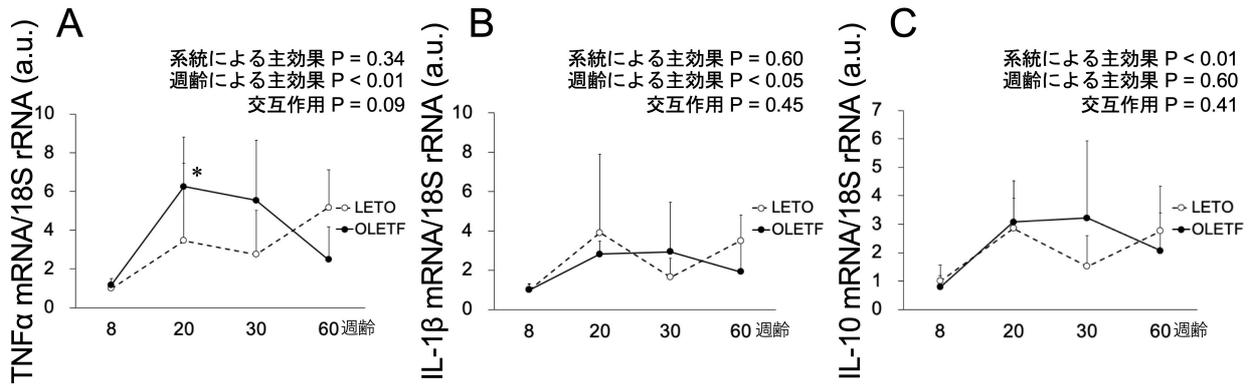


図 6. 肝臓における各種サイトカインの mRNA 発現量

A TNF α mRNA 発現量. B IL-1 β mRNA 発現量. C IL-10 mRNA 発現量.

* 同一系統における 1 時点前の週齢に対する有意差 ($p < 0.05$)

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した.

て有意に高値を示した.

LETO ラットの体重に占める肝臓湿重量は、8 週齢から 20 週齢にかけて有意に減少した. OLETF ラットの体重に占める肝臓湿重量は、30 週齢から 60 週齢にかけて有意に増加した. また、20 週齢、30 週齢、60 週齢において OLETF ラットの体重に占める肝臓湿重量は LETO ラットと比較して有意に高値を示した.

肝臓のトリグリセリド量に関して、LETO ラットでは 8 週齢から 60 週齢までわずかに増加した(図 5C). 一方、OLETF ラットの肝臓におけるトリグリセリド量は、8 週齢から 20 週齢にかけて有意に増加し、20 週齢から 30 週齢にかけてはほぼ同値で推移した後、30 週齢から 60 週齢にかけて有意に減少した. 8 週齢から 30 週齢において、OLETF ラットの肝臓におけるトリグリセリド量は LETO ラットと比較して有意に高値を示していたが、60 週齢では有意に低い傾向 ($p = 0.08$)を示した.

肝臓の Oil Red O 染色所見に関して、LETO ラットでは 8 週齢から 60 週齢にかけて切片全体における陽性反応が次第に増強した(図 5D). 一方、

OLETF ラットでは、8 週齢において既に陽性反応が強く、20 週齢と 30 週齢では、その陽性反応は肝小葉に局在し、切片全体で見ると斑状に強い陽性反応が存在した. 60 週齢では陽性反応が減衰した.

4.2. 肝臓に由来するサイトカイン発現量の推移

LETO ラット、OLETF ラットともに肝臓における TNF α の発現量は 8 週齢以降に増加しており、OLETF ラットのみ 8 週齢と 20 週齢の間、及び 8 週齢と 30 週齢の間で有意差を認めた(図 6A). また 20 週齢と 30 週齢において、OLETF ラットの肝臓における TNF α の発現量は LETO ラットと比べて有意に高い傾向を認めた(20 週齢 $p = 0.06$, 30 週齢 $p = 0.10$). 一方、60 週齢において、OLETF ラットの肝臓における TNF α の発現量は LETO ラットと比べて低かった.

肝臓における IL-1 β (図 6B)と IL-10(図 6C)の発現に関して、両系統ともに、8 週齢から 20 週齢にかけてやや増加したが、週齢間に有意差を認めなかった. 肝臓における IL-6 の発現は、両系統ともに、全ての週齢において検出限界以下であった.

考察

本研究で対象とした OLETF ラットは、以下のような病期に区分することができた。すなわち、8 週齢は肥満を伴う耐糖能障害、20 週齢は肥満の進行、並びに高インスリン血症、30 週齢は肥満の進行、並びに高インスリン血症から低インスリン血症への移行、60 週齢は肥満から痩せへの移行、並びに低インスリン血症という病期と捉えることができ、高血糖症は常に進行した。OLETF ラットの脂肪組織におけるサイトカイン発現量の経時的变化として、IL-6 の発現量が 30 週齢までは有意に増加し、その後は有意に低下していた。また、IL-10 の発現量が 20 週齢までは有意に増加し、その後は低下していた。一方、OLETF ラットの肝臓において顕著な発現を認めたサイトカインは TNF α であり、その発現量は 20 週齢から有意に増加し、30 週齢まで増加し続け、その後減少した。よって、肥満が進行した直後は肝臓における TNF α と脂肪組織における IL-10 の発現量が増加し、肥満が継続することで脂肪組織における IL-6 の発現量が増加していた。肝臓における TNF α の発現量は体重、及び肝臓におけるトリグリセリドの含有量と推移が類似しており、肥満の進行や異所性脂肪の蓄積に依存する可能性が示された。

脂肪組織由来の IL-6 は脂肪組織にインスリン抵抗性を誘発することが知られている¹⁰⁾。本研究では、OLETF ラットの高血糖症は加齢とともに悪化していたことから、OLETF ラットの脂肪組織における IL-6 の過剰発現は耐糖能障害を誘発し、それに起因して高血糖症を悪化させた可能性がある。しかし、本研究における OLETF ラットの高血糖症は、脂肪組織における IL-6 の発現が過剰に増加する以前の週齢、すなわち 8 週齢や 20 週齢において既に確認されている。よって、病期の後半における高血糖症には脂肪組織由来の IL-6 がアクセレーターとして作用し、病期の初期においてはイニシエーター

として別の因子が関与していると考えられる。この病期の初期における高血糖症には、脂肪組織由来の炎症性サイトカインではなく、過剰に増加した内臓脂肪の蓄積によって誘導された耐糖能障害が関与していた可能性がある。脂肪細胞に蓄積されたトリグリセリドは遊離脂肪酸として放出され、その脂肪酸が過剰な場合は肝臓における取り込み量が増加する¹¹⁾。本研究の 8 週齢における肝臓のトリグリセリド量に関して、OLETF ラットは LETO ラットよりも有意に高値を示した。肝臓の実質への中性脂肪の蓄積が原因となってインスリンシグナルの伝達障害を引き起こすことが報告されており¹²⁾、本研究の 8 週齢でも同様に、インスリンシグナルの伝達障害が存在した可能性がある。各種脂肪酸が増加した肝臓ではインスリンシグナルの伝達障害が生じ、インスリン抵抗性が引き起こされる¹¹⁾。よって、病期の初期における高血糖症は内臓脂肪の過剰な蓄積によって引き起こされ、その後の高血糖症の進行には脂肪組織由来の IL-6 の関与が加わった可能性がある。

また、本研究の OLETF ラットでは、8 週齢から 20 週齢にかけて脂肪組織における IL-10 の発現が有意に増加していた。脂肪組織における IL-10 の発現は脂肪量の増減に依存するため¹³⁾、LETO ラットと OLETF ラットの両系統ともに IL-10 の発現は 8 週齢から 20 週齢にかけて増加したが、脂肪量の増加がより顕著であった OLETF ラットにおいてのみ、統計学的な有意差が生じたと考えられる。脂肪組織における IL-10 の分泌は、主に組織マクロファージに由来すると考えられている¹⁴⁾。脂肪組織における組織マクロファージは肥満の進行と併せて極性が変化することが知られており、非肥満の脂肪マクロファージは IL-10 などの抗炎症性サイトカインを主として分泌するが、極性が移行した肥満の脂肪マクロファージは IL-6 や TNF α などの炎症性サイトカインを分泌するようになる¹⁴⁾。よって、20 週齢の OLETF

ラットに認めた IL-10 の増加は生理的な脂肪増加によるものであるが、20 週齢から 30 週齢にかけて認めた IL-10 の減少を伴う IL-6 の更なる増加は、マクロファージの極性が抗炎症性から炎症性に移行するような病理を示している可能性がある。実際、本研究の OLETF ラットでは、20 週齢で精巣上体脂肪組織に CLS が出現し、30 週齢でも同様に出現していた。また、OLETF ラットの精巣上体脂肪重量は、20 週齢から 30 週齢にかけて有意な差を認めなかった。よって、20 週齢頃から慢性炎症を発症し、30 週齢にかけてそれが継続したと考えられるため、20 週齢から 30 週齢にかけてマクロファージの極性が移行したことで IL-6 の過剰発現を引き起こした可能性がある。また、OLETF ラットの脂肪組織に認めた IL-10 と IL-6 の増加は、30 週齢から 60 週齢にかけて生じた脂肪量の減少を伴う体重減少と併せるようにして、60 週齢では発現量の増加を認めなくなった。IL-6 はインスリン抵抗性を引き起こすことで糖代謝よりも脂質代謝を相対的に促進するため¹⁵⁾、30 週齢において生じた IL-6 の過剰発現によってインスリン抵抗性が進行した結果、30 週齢から 60 週齢にかけて脂肪の分解が促進され、60 週齢では体重が顕著に減少したと考えられる。

OLETF ラットの体重と肝臓重量、及び肝臓におけるトリグリセリド含有量は、8 週齢の時点で LETO ラットより有意に高値を示した。耐糖能障害を誘発する因子として肝臓の異所性脂肪が指摘されている²⁾。本研究において耐糖能障害は 8 週齢の時点で既に起こっており、この時点での耐糖能障害は肝臓の異所性脂肪の蓄積によって誘導された可能性がある。一方、肝臓における TNF α の発現量について、8 週齢時点では LETO ラットと OLETF ラットの間有意差を認めなかったが、20 週齢から 30 週齢にかけて OLETF ラットは LETO ラットと比較して有意に高い傾向を認めた。20 週齢から 30 週齢時点の肝臓における TNF α の過剰発現は、肝臓にお

ける異所性脂肪の過剰な蓄積が継続したことによると考えられる。すなわち、脂肪組織に由来する IL-6 に先行して、異所性脂肪の蓄積が継続することによる肝臓由来の TNF α は、20 週齢以降の耐糖能障害に対してアクセレーターとして作用したと考えられる。

本研究において、脂肪組織における TNF α と IL-1 β の発現量は、肥満や耐糖能障害の進行に応じた有意な変化を認めなかった。脂肪組織における TNF α の発現に関して、本研究の OLETF ラットでは有意差を認めなかったが、脂肪組織における IL-6 と類似した推移が確認されており、データのばらつきにより有意差が検出されなかった可能性がある。脂肪組織における IL-1 β の発現に関して、両系統とも全ての週齢間において反応が乏しかった。肥満に伴う IL-1 β の発現には脂質の過剰摂取が関与しており、高脂肪食誘導性マウスでは、IL-1 β の発現量が増加している¹⁶⁾。肥満で IL-1 β は増加するが、今回のモデルは普通食の過食で肥満となったモデルであったため、肥満モデルの違いにより、その発現量に顕著な差を見出せなかった可能性がある。また、肝臓における IL-6、IL-1 β 、IL-10 の発現量に関しても、両系統間に顕著な差は検出されなかった。肥満における血清 IL-6 のほとんどが脂肪組織に由来する¹⁷⁾ため、肝臓では IL-6 の mRNA が検出されなかったと考えられる。IL-1 β に関して、高脂肪食とフルクトースの併用による肥満モデルにおいて、肝臓での発現量の増加が確認されている¹⁸⁾。このモデルは本研究のような普通食による肥満モデルと比較して肝病変の進行が早い。本研究の Oil Red O 染色所見では、進行した肝病変を示すほどの病理所見が観察されなかったことから、肝臓における IL-1 β が発現するほどの強い炎症には至らなかった可能性が考えられる。IL-10 は主に組織マクロファージから分泌される¹⁹⁾。過剰な肥満のような慢性炎症では、この組織マクロファージは極性が移行

するため、IL-10 の発現は相対的に減少する。本研究では、両系統ともに 8 週齢から 20 週齢にかけて肝臓における IL-10 の発現がやや増加するものの、その後は同程度の発現量であったことから、普通食飼育では IL-10 の発現量を変化させるようなマクロファージの極性変化を伴うほどの慢性炎症が肝臓には誘導されなかった可能性がある。

本研究では、糖尿病の病期の初期過程において、内臓脂肪の過剰な蓄積や肝臓における異所性脂肪の増加により耐糖能障害が引き起こされる可能性が示された。そして肥満の進行と共に肝臓において TNF α が過剰発現し、更なる肥満の進行と共に脂肪組織における IL-6 が過剰発現し、これらの肝臓由来の TNF α と脂肪組織由来の IL-6 は耐糖能障害のアクセレーターとして作用していることが示唆された。本研究の限界として、病期の長い群のサンプルサイズが小さいことがあげられる。60 週齢時点における OLETF ラットは糖尿病の末期であり、ドロップアウトしたラットが存在する。今後は病期の長い群の週齢設定を再検討することが必要と考えられる。加えて、本研究では炎症性サイトカインに関して、mRNA の発現量や CLS 所見の確認による間接的な証拠を示しており、慢性炎症マーカーの計測は行なっていない。炎症性サイトカインや慢性炎症マーカーを直接計測することで、本研究の結果の解釈を強化できると考えられる。これらの限界が存在するものの、脂肪燃焼に関与するマイオカインを分泌するには有酸素運動や高強度運動が適しており、運動強度を下げるとその分泌は減少し、脂肪燃焼の効果は下がると考えられている²⁰⁾。よって、本研究の結果を理学療法にそのまま応用すると、1) 肥満を伴う高血糖で慢性炎症が確認されないような糖尿病の病期の初期では、脂肪燃焼の促進を目的とした有酸素運動を行う、2) 肥満と高血糖が進行し慢性炎症が出現する病期中期では、肥満を改善する運動だけではなく、抗炎症作用を有

するマイオカインの分泌を促すような高強度運動も併用する、3) 体重減少と高血糖を呈する病期の後期では、低血糖や合併症に注意しつつ、低負荷高頻度の運動によって糖代謝の活性化を図るなど、運動処方検討材料となり得る可能性があるが、その有効性は引き続き検証する必要がある。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない。

謝辞

本研究の実施にあたり、ご協力いただいた広島大学自然科学研究支援開発センターのスタッフの皆様に深謝いたします。

文献

- 1) Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, et al: Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 105: 141-150.
- 2) 田村好史, 筧佐織, 竹野景海: 2 型糖尿病における異所性脂肪の役割. *糖尿病* 2016; 59: 730-733.
- 3) Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al: Spontaneous Long-term Hyperglycemic Rat With Complications: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Strain. *Diabetes* 1992; 41: 1422-1428.
- 4) Fujita N, Goto N, Nakamura T, et al: Hyperbaric Normoxia Improved Glucose Metabolism and Decreased Inflammation in Obese Diabetic Rat. *J Diabetes Res* 2019; 2019: 2694215.
- 5) Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, et al: Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes

- to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J Hepatol* 2010; 52: 727-736.
- 6) Murano I, Barbatelli G, Parisani V, et al: Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008; 49: 1562-1568.
 - 7) Mulder P, Morrison MC, Wielinga PY, et al: Surgical removal of inflamed epididymal white adipose tissue attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in obesity. *Int J Obes (Lond)* 2016; 40: 675-684.
 - 8) Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, et al: The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2014; 510: 84-91.
 - 9) Kirwan JP, Sacks J, Nieuwoudt S: The essential role of exercise in the management of type 2 diabetes. *Cleve Clin J Med* 2017; 84: S15-S21.
 - 10) Fève B, Bastard JP: The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5: 305-311.
 - 11) Boden G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46: 3-10.
 - 12) Samuel VT, Shulman GI: Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012; 148: 852-871.
 - 13) Juge-Aubry CE, Somm E, Pernin A, et al: Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine* 2005; 29: 270-274.
 - 14) Tedgui A, Mallat Z: Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res* 2001; 88: 877-887.
 - 15) Ji C, Chen X, Gao C, et al: IL-6 induces lipolysis and mitochondrial dysfunction, but does not affect insulin-mediated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43: 367-375.
 - 16) Tack CJ, Stienstra R, Joosten LA, et al: Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family. *Immunol Rev* 2012; 249: 239-52.
 - 17) Moschen AR, Molnar C, Geiger S, et al: Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. *Gut* 2010; 59: 1259-64.
 - 18) Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, et al: Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain Behav Immun* 2012; 26: 931-941.
 - 19) Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.
 - 20) Mu WJ, Zhu JY, Chen M, et al: Exercise-Mediated Browning of White Adipose Tissue: Its Significance, Mechanism and Effectiveness. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 11512.

Original article

Changes in inflammatory cytokines in epididymal adipose tissue and liver of OLETF rats

Takaishi Kaho¹, Oshima Takaya¹, Goto Natsuki², Fujita Naoto^{1*}, Urakawa Susumu¹

1. Department of Musculoskeletal Functional Research and Regeneration, Graduate School of Biomedicine and Health Sciences, Hiroshima University
2. Department of Rehabilitation, Miyazaki University Hospital

ABSTRACT

【Background and purpose】 Inflammatory cytokines driven from the adipose tissue and liver are involved in glucose intolerance associated with obesity. However, the changes in the progression of obese type 2 diabetes remain unknown. This study aimed to investigate the changes in chronic inflammation-related cytokines in the adipose tissue and liver focusing on progression of obesity and glucose intolerance in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats.

【Methods】 Male OLETF and Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats were used as animal models of obese type 2 diabetes and non-obese diabetes, respectively. Expression level of inflammatory cytokines (IL-6, TNF α , IL-1 β , and IL-10) in the epididymal adipose tissue and liver were measured at 8, 20, 30, and 60-week-old.

【Results】 For the wet weight of epididymal adipose tissue and triacylglycerol levels in the liver, the values were significantly higher in OLETF rats than in LETO rats from 8 to 30-week-old. Conversely, the values were significantly lower in OLETF rats than in LETO rats at 60-week-old. Impaired glucose tolerance was confirmed in OLETF rats at 8-week-old, and deteriorated by 60-week-old. The expression level of IL-6 in the epididymal adipose tissue of OLETF rats significantly increased from 20 to 30-week-old and significantly decreased from 30 to 60-week-old. The expression level of TNF α in liver of OLETF rats significantly increased from 8 to 20-week-old and significantly decreased from 30 to 60-week-old.

【Discussion】 Excessive visceral fat accumulation and increased ectopic fat could cause glucose intolerance in the early stage of type 2 diabetes. Additionally, TNF α driven from the liver and IL-6 driven from the adipose tissue could act as accelerators for glucose intolerance with progression of obesity.

***Correspondence:**

Fujita Naoto
Department of Musculoskeletal Functional Research and
Regeneration, Graduate School of Biomedicine and Health
Sciences, Hiroshima University
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8553
E-mail: fujitan@hiroshima-u.ac.jp

Key words:

Inflammatory cytokines, Obese type 2 diabetes, Adipose tissue

First submitted Nov. 29. 2021
Accepted Jan. 06. 2022