

マクロファージによる全身の脂質代謝制御と肥満予防

大阪大学微生物病研究所 発癌制御研究分野

木村 哲也

<はじめに:肥満症の現状>

肥満とその合併症(糖尿病、脂質異常症、高血圧症、非アルコール性脂肪性肝炎、心筋梗塞、脳卒中など)は世界的に増加の一途を辿っている。Body mass index 30以上の肥満患者はいまや世界で6億7000万人に上り、肥満に起因する経済的損失は毎年2兆ドルと見積もられている。しかし肥満症の治療法は限られており、胃縮小手術や、マジンドールのような非常に副作用の多い薬物による治療が一部の高度肥満者で行われている程度である。降圧薬やスタチン、経口血糖降下薬のように一般の患者が服用できるような薬物を開発し、肥満症やメタボリックシンドロームを改善させられれば、わが国を含め国際的な健康増進に貢献しうる。また肥満の発症機構に関する医学知識は現在きわめてシンプルなものに留まっている。すなわち飽食の時代となりカロリー摂取が過剰である一方、エネルギーを消費するための運動は不足し、その結果、摂取エネルギーのバランスが大きくプラスとなり肥満を発症するという考え方である。本研究は、これまで知られていない脂質代謝機構に光を当て肥満の新たな病態生理を解明すること、また肥満治療への応用を模索する試みとして行った。

<肥満症治療標的としてのマクロファージ>

本研究における我々の作業仮説は、マクロファージに介入し肥満症を改善できないかということである。マクロファージは全身ほぼ全ての臓器に分布する細胞で、組織中の死細胞を貪食し各臓器のホメオスタシスに関与している。近年の研究により、臓器ごとにマクロファージの遺伝子発現プロファイルや、マクロファージのorigin(骨髄・fetal liver・yolk sacなど)が異なることが示唆されている。マクロファージは自然免疫に関わる細胞としても有名で、外来微生物の構成分子に対する多種類の受容体を、細胞表面および細胞内に発現している。宿主に対する外来微生物の侵略をこれらの受容体で感知し、TNF- α やIL-6といったサイトカインを放出し炎症を惹起する。さらに近年、肥満症患者の脂肪組織でlow gradeな炎症が持続し、それがインスリン抵抗性を惹起して肥満2型糖尿病の発症要因となっている可能性が示唆された。また、敗血症患者における低血糖の発症機序として、肺などマクロファージが特に多い組織でグルコースが消費されていることが知られている。このようにマクロファージは、生体組織のホメオスタシスに関わり、全身レベルでの代謝にも(少なくとも糖代謝においては)明らかに影響する。加えて、マクロファージにはLXR, PPAR γ といった脂質関連転写因子が豊富に発現し、細胞表面にもABCA1, LDL-R, FATP1などの脂質輸送体が多数発現する。これらの事実に基づき我々は、マクロファージが全身の脂質代謝に関わる可能性と、肥満症の治療標的となる可能性について検討した。

<肥満が抑制されたマウス>

何種類かの動物を用いて検討したところ、コンディショナルノックアウトマウスの1系統(以下cKOマウス)で、高脂肪食負荷後の体重増加の程度が軽いことを発見した。たとえば膠原病患者などで、炎症が続き、患者が「痩せ細る」例があるが、cKOマウスで血中サイトカイン濃度を測定したところ、炎症によって体重増加不良が起きているのではないことが確認された。cKOマウスにおける体重増加抑制は雌雄とも認められ、再現性も確認できた。複数の飼料会社から購入した組成の異なる高脂肪食を与えても同様の再現性が認められるかどうかは検討中である。

<肥満抑制メカニズムの探索-マウス個体レベルでの検討>

cKO個体レベルでの代謝パラメータの測定を行った。体重・運動能・摂餌量・呼吸交換比・中心体温・脂肪性下痢の有無を測定した。肥満については高脂肪食飼育下での3~4か月間の体重測定と、MRIおよびCTでの皮下脂肪量・内臓脂肪量の評価を行った。さらに脂肪組織を光学顕微鏡および蛍光顕微鏡にて観察し、脂肪細胞内に蓄えられたlipid dropletのサイズを定量化した。運動能は本助成期間中、耐運動試験として評価したが、将来さらに予算が得られればビーム横断回数での評価も行いたい。運動試験においてはControlマウスとcKOマウスに差はなかった。摂餌量は体重当たりの1日摂餌量で測定した。ControlマウスとcKOマウスで差はなかった。呼吸交換比(RER)は、マウスを1匹ずつ密閉チャンバーに入れ2日間飼育し、専用の装置にて解析した。Light cycle、Dark cycleいずれにおいてもControlマウスとcKOマウスで差はなかった。中心体温はオス・メス、若齢・高齢のマウスでそれぞれグループごとに比較したが、ControlマウスとcKOマウスで差はなかった。また紙製床敷きおよび糞便の形状を詳細に観察したが、脂肪性下痢の所見は一切認められなかった。これらの結果を総合すると、cKOマウスが肥満にならないメカニズムとして、カロリー摂取不足・脂質吸収障害・過剰な運動・脂肪酸を通常より多く燃焼し熱として発散している、といったメカニズムは否定的であった。従来知られているこれらの肥満(予防)メカニズムに一切差がなかったため、cKOマウスで肥満を抑制している未知の脂質代謝機構を手探りで模索せざるを得ないという結論に至った。

<本当にマクロファージが肥満を抑制しているのか？>

本研究で用いるマウスは*LysM-Cre*遺伝子で細胞種特異的なノックアウトが誘導されるマウスではあるが、ノックアウトが起こるとされるマクロファージで本当にoff-targetな遺伝子ノックアウトが起きていないかどうかは非常に重要である。もともと、肥満に関わる体中すべての種類の細胞・組織を考えてみるならば、脂肪細胞だけではなく、視床下部・下垂体・味覚嗅覚感知系・消化器系・甲状腺・副腎・膵臓・筋肉・肝臓など無数に可能性があり、これに加えて臓器間のクロストークまで考慮すればさらに可能性は広がる。さらに、高脂肪食負荷後数か月間の間にoff-target gene deletionが起きないか何度もチェックすることは不可能である。

この疑問を解決するため、骨髄移植実験を行った。すなわちcKOマウスまたはControlマウスから、野生型マウスへ骨髄移植を行い、高脂肪食を与えて飼育した。その結果、cKOマウスの骨髄を移植された野生型マウスでのみ肥満が抑制され、Controlマウスの骨髄を移植された野生型マウスと体重差が認められた。この実験により、少なくとも「血液系に属する細胞が肥満を抑制できる」ことが確実に、研究が前進した。

<肥満が起らないメカニズムの探索-網羅解析による検討など>

前述のとおり、マクロファージが肥満を抑制することが確実となったので、その鍵となる分子またはシグナル経路を探索する目的でマクロファージのトランスクリプトームを解析した。cKOマウスとCtrlマウス由来マクロファージのRNA、また高脂肪食を3ヶ月与えたcKOマウスおよびControlマウスの皮下脂肪・内臓脂肪・褐色脂肪組織・筋肉からそれぞれ抽出したRNAをマイクロアレイで解析した。cKOマクロファージ由来のトランスクリプトームにおいて、fatty acid binding proteinなどいくつかの脂質結合蛋白の発現が上昇していた。これらが肥満抑制に関与しているのか、またその詳細な機構はどのようなものか、一つ一つ検討していく予定である。また炎症に関しては、組織トランスクリプトームにおいてTNF- α 、IL-6、IL-12p40といった炎症性遺伝子の発現は無視できるレベルであり、SPF環境で飼育する限り前述のサイトカイン蛋白の血中濃度も検出限界以下であった。

さらにこれらのマウス由来マクロファージに含まれる脂質と、cKOおよびControlマウスの血中に含まれる脂質を網羅的に解析した。いくつかの脂質に大きな変動が認められ、今後研究を進める予定である。

別の角度からのアプローチとして、全身へ脂質を輸送するパッケージであるリポ蛋白の解析も進めている。cKOおよびControlマウスの血漿リポ蛋白を採取し、電気泳動にて全体像をまず比較した。cKOマウス由来のリポ蛋白泳動像ではControlマウスで認められない小さな山が1つ観察され、今後の手がかりになると考えている。

脂肪細胞の脂質取り込み/貯蔵を阻害するような内分泌因子または生理活性脂質をマクロファージが分泌する

可能性についてもin vitroで3T3-L1細胞とマクロファージの共培養により検討したが、3T3-L1由来のadipocyte-like cellsおよび細胞中のlipid dropletに明らかな変化は見られなかった。

<今後の展開>

cKOマウスの体内における脂質動態の解析をさらに進めていく。すなわち食物から吸収された脂質が、どのようにして脂肪組織への蓄積を免れているのかを、マウス個体レベル・組織レベル・細胞レベルの解析を通じ、マクロからミクロの方向で段階的に突き止めていく予定である。最終的にはどのような物質が肥満抑制を仲介しているのかまで突き止め、治療薬として応用したい。

この間の研究成果は以下のとおり発表した。

<学術論文>

1. Hayama Y, **Kimura T***, Takeda Y, Nada S, Koyama S, Takamatsu H, Kang S, Ito D, Maeda Y, Nishide M, Nojima S, Sarashina-Kida H, Hosokawa T, Kinehara Y, Kato Y, Nakatani T, Nakanishi Y, Tsuda T, Koba T, Okada M, Kumanogoh A*. *Journal of Immunology* 2018, 200:3790-3800.
2. **Tetsuya Kimura***, Atsushi Kumanogoh, Masato Okada. *Critical Reviews in Immunology* 2018 38:403-414.

<学会・研究会発表>

1. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 第1回若手研究助成金 成果報告会
「マクロファージを介した肥満・脂肪肝・糖尿病予防」○木村哲也
東京国際フォーラム 2018年5月25日(口頭発表)
2. IFRc 40th Colloquium “Prevention of Obesity by Macrophages” ○Tetsuya Kimura, Masato Okada.
大阪大学免疫学フロンティア研究センター 2018年12月19日(口頭発表)