

【論文の内容の要旨】

論文題目 アポトーシス抑制因子 AIM を基盤とした
メタボリックシンドローム病態形成機構の解明

氏名 黒川 淳

【背景】

メタボリックシンドロームは、近年の生活環境の著しい変化に伴い急速に表面化した現代病であり、内臓脂肪型肥満とインスリン抵抗性を基礎とし、糖尿病や動脈硬化性疾患などの制御困難な疾患が連鎖的に発症する。従来、これらの疾患群に対し、肥満の改善を目的とした食事療法や運動療法、血糖値・血圧・コレステロール値などの改善を目的とした投薬療法が行われてきた。しかしながら、生活様式の急激な変化や高齢化社会への移行の状況を鑑みれば、これまでの対症療法ではなく、メタボリックシンドロームの病態形成機構に基づく予防法および根本的な治療法の開発が求められている。

メタボリックシンドロームの病態形成を理解する上で極めて重要なイベントは、脂肪組織リモデリングと慢性炎症の惹起・増悪である。脂肪組織は、実質細胞である脂肪細胞だけではなく、脂肪前駆細胞、血管構成細胞、線維芽細胞、免疫細胞などの間質細胞により構成されている。肥満に伴い、脂肪組織では、脂肪細胞の肥大化、マクロファージやリンパ球などの免疫細胞の浸潤・蓄積、細胞外マトリックス過剰生産などに特徴づけられる脂肪組織像のダイナミックな変化が認められ、これは脂肪組織リモデリングと呼ばれている。脂肪組織リモデリングの過程において、脂肪組織に浸潤・蓄積したマクロファージは、脂肪細胞と相互作用し、IL-6、IL-1 β 、TNF α などの炎症性サイトカインや MCP-1 などのケモカインを産生することにより脂肪組織に慢性炎症を引き起こし、正常な脂肪組織の機能に大きな影響を与える。

脂肪組織は、余剰のエネルギーをトリグリセリドとして蓄積する貯蔵器官であると同時に、アディポサイトカインと総称される生理活性物質を分泌する内分泌器官としての側面を持つ。組織リモデリングに伴う慢性炎症により、内分泌器官としての機能に異常を来した脂肪組織は、全身性のインスリン抵抗性をもたらし、2型糖尿病や脂肪性肝疾患の発症リスクを上昇させるだけでなく、動脈硬化病変を増悪させ脳・心血管イベント引き起こすと考えられる。

病巣部位のマクロファージは、炎症性サイトカインやケモカインに限らず様々な生理活性物質を産生している。AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) は、マクロファージが特異的に産生する分泌タンパク質であり、マクロファージ自身を含めた様々な細胞のアポトーシ

スを抑制する機能を持つことが知られている。動脈硬化病巣の泡沫化マクロファージは、AIM を強く発現し、自身のアポトーシス抵抗性を著しく高めるため、病巣での泡沫化マクロファージの蓄積が促進され、動脈硬化症を増悪させる。実際に、AIM 欠損 (AIM^{-/-}) マウスでは動脈硬化病変が著しく減少する。また、AIM は、肝疾患を含む様々な疾患において血中濃度が上昇すること、多機能タンパク質としての側面を持つことが示唆されており、動脈硬化症だけではなく、メタボリックシンドロームを含む様々な疾患の病態形成機構に関与することが予想される。

すなわち、マクロファージと AIM に着目した研究を展開することで、メタボリックシンドロームの病態形成機構の一端を明らかにできる可能性がある。

【目的】

先に述べたように、肥満に伴い脂肪組織へ浸潤・蓄積したマクロファージは、脂肪組織を構成する様々な細胞と複雑な相互作用を起こし、慢性炎症やインスリン抵抗性を惹起することで内分泌器官としての正常な脂肪組織機能を破綻させ、メタボリックシンドロームの病態形成に深く関与する。しかしながら、より根本的な原因である、肥満に伴い脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導する機序については明確な解答が得られておらず、メタボリックシンドロームの病態形成機序には依然として議論の余地がある。

また、多機能タンパク質としての側面を有する AIM は、動脈硬化症に限らず様々な疾患に関与する可能性があり、メタボリックシンドロームの病態形成においても重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

ゆえに、本研究では、メタボリックシンドローム病態形成における AIM の役割の解明を目的とし、研究を展開した。

【結果】

《第 1 章 脂肪細胞に対する AIM の新規機能の同定》

脂肪組織における AIM の機能や役割については、これまで報告がなく不明であった。そこで、本研究では、まず脂肪組織における AIM の機能と役割の解明を試みた。詳細な解析の結果、AIM が脂肪細胞に対して直接作用すること、アポトーシス抑制以外の新規機能を持つこと、さらに、それらを支える分子メカニズムの一端を明らかにした。

・脂肪組織へ浸潤したマクロファージは AIM を強く発現する

AIM^{+/+}マウスに、高脂肪食 (HFD) を 20 週間負荷し、脂肪組織へ浸潤したマクロファージにおける AIM の発現を評価した。非肥満状態の脂肪組織では AIM の発現はほとんど認められないが、肥満に伴い脂肪組織へと浸潤した IL6 陽性の M1 マクロファージでは AIM の発現が認められた。また、脂肪細胞では AIM の発現が認められなかった。

・AIM は CD36 を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞に取り込まれる

AIM の遺伝子発現は M1 マクロファージに限定されていたが、免疫組織化学による解析では脂肪細胞にも AIM のシグナルが認められた。この知見は、マクロファージから分泌され

た AIM が、近傍の脂肪細胞に対して何らかの影響を与える可能性を示唆させるものであった。そこで、脂肪細胞に対する AIM の作用を詳細に解析した。免疫蛍光染色ならびに免疫電子顕微鏡観察により、AIM は脂肪細胞内部にエンドサイトーシスにより取り込まれることを明らかとした。また、AIM は初期エンドソームに局在するが、後期エンドソームやリサイクリングエンドソーム、リソソームなどには局在しないことから、初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟過程で細胞質へと局在を変化させることが示唆された。さらに、CD36^{-/-}マウスや CD36 中和抗体を作用させた脂肪細胞では AIM のエンドサイトーシスによる取り込みが認められないことから、AIM のエンドサイトーシスを仲介する分子は、脂肪細胞表面に発現するスカベンジャー受容体 CD36 であると結論付けた。

・AIM は脂肪酸合成酵素 (FAS) インヒビターとして機能し、脂肪細胞に Lipolysis を誘導する

AIM がエンドサイトーシスにより脂肪細胞に取り込まれることから、脂肪細胞内で何らかの因子と相互作用し機能する可能性が示唆された。そこで、IP-MS による網羅的解析などにより脂肪細胞内で AIM と相互作用する因子を探索したところ、脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase: FAS) と結合することを見出した。また、AIM は FAS と結合し、機能的・構造的にその酵素活性を抑制することを見出した。さらに、AIM による FAS 酵素活性阻害は、脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化を抑制することや成熟脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導し油滴サイズを減少させることを明らかとした。また、AIM^{-/-}マウスでは AIM^{+/+}マウスよりも HFD 負荷による肥満が亢進すること、AIM を投与した AIM^{-/-}マウスではこの表現系が抑制されることを見出した。すなわち、AIM はマクロファージに対するアポトーシス抑制能以外に、内在性 FAS インヒビターとしての側面を持ち、脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する新規機能を持つことが明らかとなった。

《第 2 章 メタボリックシンドローム病態形成における AIM の役割》

第 1 章で述べたように、本研究の結果から、AIM は脂肪細胞に作用し Lipolysis を誘導する機能を持つことが明らかとなった。肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導する機構については不明であるが、近年、脂肪細胞の Lipolysis などにより放出される飽和脂肪酸が、肥満に伴うマクロファージ浸潤・蓄積に関与することが報告されている。そこで、AIM による Lipolysis がメタボリックシンドロームの病態形成に重要な脂肪組織へのマクロファージ浸潤・蓄積にどのような影響を与えるか検討した。

・AIM は肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤および蓄積に関与する

HFD を 12 週間負荷した AIM^{+/+}および AIM^{-/-}マウスの脂肪組織におけるマクロファージの浸潤と蓄積を評価したところ、AIM^{-/-}マウスの脂肪組織では肥満に伴うマクロファージの浸潤と蓄積が著しく抑制されていることを見出した。AIM と脂肪組織へのマクロファージ浸潤・蓄積の関係を詳細に解析するため、HFD 負荷時における AIM^{+/+}および AIM^{-/-}マウスの血中グリセロール濃度、血中 FFA 濃度を経時的に解析したところ、AIM^{-/-}マウスでは HFD 負荷に伴う血中グリセロール濃度、血中 FFA 濃度の上昇が抑制されていた。また、AIM^{+/+}マウスにおいて、HFD 負荷に伴い血中 AIM 濃度が著しく上昇することを見出した。さらに、

非肥満および肥満した AIM^{-/-}マウスへの AIM 投与により、脂肪組織へのマクロファージ浸潤・蓄積が誘導されることを明らかとした。これらの結果から、肥満に伴う血中 AIM 濃度の上昇と Lipolysis の亢進が脂肪組織へのマクロファージ浸潤・蓄積に大きな影響を与えることが示唆された。

・AIM による Lipolysis は脂肪細胞において TLR4 シグナル伝達経路を活性化しケモカインの産生を亢進する

AIM による脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導する機構を解明するため、AIM および AIM を作用させた脂肪細胞培養上清のマクロファージ走化能を評価した。その結果、AIM にはマクロファージ走化能が認められなかったが、AIM を作用させた脂肪細胞の培養上清には強いマクロファージ走化能が認められた。AIM による脂肪細胞の Lipolysis 亢進とマクロファージ走化能の関係について詳細に解析したところ、AIM を作用させた脂肪細胞では MCP-1 を含むケモカインの産生が著しく亢進していることが明らかとなった。さらに、脂肪細胞におけるケモカインの産生亢進は、Lipolysis により放出された脂肪酸が、脂肪細胞の TLR4 シグナル伝達経路を活性化するためであることを明らかとした。また、AIM を投与した TLR4^{-/-}マウスでは、Lipolysis が亢進するにも関わらず、脂肪組織へのマクロファージ浸潤は誘導されないことを明らかとした。ゆえに、AIM による Lipolysis は、脂肪細胞において TLR4 シグナル伝達経路を活性化しケモカインの産生を亢進することで脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導すると考えられる。

・AIM^{-/-}マウスでは肥満に伴う慢性炎症およびインスリン抵抗性が改善される

肥満 AIM^{-/-}マウスの脂肪組織では、マクロファージの浸潤および蓄積が抑制されることから、脂肪組織における慢性炎症ならびにインスリン抵抗性が改善されている可能性が示唆された。そこで、肥満 AIM^{-/-}マウスにおける炎症とインスリン感受性について解析した。AIM^{-/-}マウスの脂肪組織では、AIM^{+/+}マウスの脂肪組織と比較して *mfa*、*IL-6*、*IL-1β* の遺伝子発現が有意に抑制されていた。また、血中 TNF および *IL-6* 濃度が有意に低下していた。さらに、AIM^{-/-}マウスでは脂肪組織におけるケモカイン遺伝子 (*mcp-1*, *mcp-2*, *mcp-3*, *ccl5/rantes*) の発現および血中 MCP-1 濃度の上昇が有意に抑制されていた。また、耐糖能試験 (Glucose Tolerance Test および Insulin Tolerance Test) においても、AIM^{-/-}マウスでは AIM^{+/+}マウスと比較して良好な応答性が認められた。これらの結果から、AIM^{-/-}マウスでは、肥満に伴う慢性炎症およびインスリン抵抗性が改善され、正常なインスリン感受性が維持されることが明らかとなった。

【総括】

本研究の結果から、AIM は、脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する機能を持つこと、この機能がメタボリックシンドロームの病態形成に極めて重要なイベントである、脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導するトリガーであることを明らかとした。本研究から得られた知見は、AIM を標的としたメタボリックシンドロームの新しい予防法や治療法の開発につながるものと期待される。