

審査の結果の要旨

氏名 黒川 淳

本研究は、メタボリックシンドローム病態形成機構の解明を目的として、マクロファージ由来の分泌タンパク質 AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) の脂肪細胞に対する機能解析ならびにメタボリックシンドロームの発症および増悪における AIM の役割の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 高脂肪食 (High Fat Diet; HFD) 負荷により食餌誘導性肥満モデルマウスを作製し、脂肪組織における AIM の発現を定量 PCR 法および免疫組織化学法により解析した結果、肥満に伴い脂肪組織に浸潤した炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) が AIM を強く発現することが示された。また、脂肪組織を構成する脂肪細胞や非肥満状態の脂肪組織では AIM の発現が認められなかった。
2. 免疫組織化学法による解析から、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が示唆されたため、脂肪細胞に対する AIM の作用を免疫染色法ならびに免疫電子顕微鏡法により解析したところ、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が示された。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減少することから、脂肪細胞表面に発現するスカベンジャー受容体 CD36 が AIM のエンドサイトーシスを仲介する分子のひとつであることが示された。
3. IP-MS による網羅的解析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) が候補因子として見出された。共免疫沈降法や FAS 酵素活性測定などの生化学的解析から、AIM は FAS の特定のドメイン (DH ドメイン、CC ドメイン、ER ドメイン、TE ドメイン) と結合し、酵素活性を低下させることが示された。すなわち、AIM は脂肪細胞において FAS インヒビターとして機能している可能性が示唆された。
4. AIM による FAS 酵素活性阻害は、脂肪前駆細胞 (3T3-L1 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が示された。また、脂肪細胞に対する AIM の効果は FAS 阻害剤である C75 と同様のものではなかった。
5. 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型が抑制されることが示された。また、AIM^{+/+}マウスおよび AIM^{-/-}マウス間における基礎代謝値に有意な差は認められなかった。さらに、AIM^{-/-}マウスでは HFD 負荷に伴う血中グリセロール濃度や血中遊離脂肪酸濃度の上昇が

抑制されていた。これらの結果から、AIM は脂肪細胞に Lipolysis を誘導することで過剰な栄養素の摂取などにより増加する脂肪組織重量を調節する生理的役割を持つ可能性が示唆された。

6. HFD 負荷 AIM^{+/+}マウスおよび AIM^{-/-}マウスの脂肪組織における M1 マクロファージの浸潤と蓄積を免疫組織化学法により解析した結果、AIM^{-/-}マウスの脂肪組織では M1 マクロファージの浸潤とそれに続く蓄積が抑制されることが示された。
7. 非肥満および HFD 負荷により肥満した AIM^{-/-}マウスへの AIM 投与により、脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤とそれに続く蓄積が誘導されることが示された。また、AIM^{+/+}マウスにおいて HFD 負荷により血中 AIM 濃度が著しく上昇することが示された。これらの結果から、血中 AIM 濃度の上昇が脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤とそれに続く蓄積に大きな影響を与えることが示唆された。
8. AIM および AIM を作用させた脂肪細胞培養上清 (AIM-Conditioned Medium: AIM-CM) のマクロファージ走化能を解析した結果、AIM 自身にはマクロファージ走化能が認められなかったが AIM-CM には強いマクロファージ走化能が認められた。
9. AIM を短時間作用させた脂肪細胞では IκBα の分解を指標とした TLR4 シグナル伝達経路の活性化が認められなかったが、AIM-CM を作用させた脂肪細胞では TLR4 シグナル伝達経路の活性化が認められた。また、TLR4 シグナル伝達経路のメディエーター分子である TIRAP の阻害剤を用いることにより、AIM-CM による TLR4 シグナル伝達経路の活性化が抑制された。
10. AIM および AIM-CM を作用させた脂肪細胞におけるケモカイン (MCP-1, MCP-2, MCP-3, CCL5/RANTES) の産生を定量 PCR 法および ELISA により解析した結果、AIM を短時間作用させた脂肪細胞ではこれらのケモカインの産生は亢進されなかったが、AIM-CM を作用させた脂肪細胞ではこれらのケモカインの産生が有意に亢進された。また、TLR4 シグナル伝達経路のメディエーター分子である TIRAP の阻害剤を用いることにより、AIM-CM によるケモカイン産生の亢進が抑制された。
11. Lipolysis により脂肪細胞から放出されることが知られているパルミチン酸やステアリン酸を用いて、脂肪細胞を刺激し、TLR4 シグナル伝達経路の活性化およびケモカイン産生の亢進を評価した。その結果、TLR4 シグナル伝達経路の活性化およびケモカイン産生の亢進が認められた。
12. AIM を投与した TLR4^{-/-}マウスでは、Lipolysis の亢進 (血中グリセロール濃度および血中遊離脂肪酸濃度の上昇、油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現低下) が認められたにも関わらず、脂肪組織における JNK のリン酸化を指標とした TLR4 シグナル伝達経路の活性化、ケモカイン産生の亢進、脂肪組織へのマクロファージ浸潤の増加は認められなかった。
13. 8 ~ 12 に記した結果より、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させることで脂肪組織へのマクロファージ

ジの浸潤を誘導する可能性が示唆された。

14. 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ところ、肥満 AIM^{-/-}マウスの脂肪組織では、肥満 AIM^{+/+}マウスの脂肪組織と比較して炎症性サイトカイン遺伝子 (*tnfa*, *IL-6*, *IL-1β*) の発現が有意に抑制されていた。また、血中 TNFα および IL-6 濃度が有意に低下していた。さらに、肥満 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示された。

以上、本論文は AIM がマクロファージに対するアポトーシス抑制能以外にも脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する機能を持つこと、Lipolysis の促進により脂肪細胞から放出された脂肪酸が脂肪細胞自身の TLR4 シグナル伝達経路を活性化させ、ケモカイン産生を亢進させることで、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の浸潤を誘導することを明らかとした点で重要であり、メタボリックシンドローム病態形成機構の解明に貢献するものであると考えられる。また、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、学位の授与に値するものと考えられる。