

192. 肥満に伴う肝代謝異常における類洞内皮細胞の役割

土屋 恭一郎

Key words : 肥満, VCAM-1, Notch, 糖尿病

東京医科歯科大学 医学部附属病院
糖尿病・内分泌・代謝内科

緒 言

肥満に伴う脂肪肝や、肝臓の糖脂質代謝異常の発症において、肝臓への白血球の浸潤が重要な役割を果たしている。肥満により肝臓内に蓄積する白血球は C-C chemokine receptor type 2 (CCR-2) 陽性であることが知られている¹⁾。CCR-2 のリガンド monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は、肥満マウスの肝臓で発現が増加することが知られており、MCP-1 過剰発現マウスは耐糖能の悪化と肝臓のインスリン抵抗性、および肝中性脂肪含有量の増加をきたすことが報告されている²⁾。即ち、肥満に伴う肝臓での MCP-1 の発現増加が、白血球の誘導を促進していることが示唆される。

肝臓は類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cells: LSEC) を有し、LSEC は肝類洞の最内層に位置して類洞と肝細胞を隔てるバリアーとして機能する。生理的には、LSEC はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、変性コラーゲンなどの巨大分子を取り込んで処理することが知られているが、肥満に伴う炎症細胞浸潤における役割は明らかでない。MCP-1 により誘導された白血球は、後類洞 (Disse 腔および肝実質細胞) に浸潤する際に LSEC のバリアーを超える必要があるが、白血球と LSEC の相互作用に関する報告はない。今回我々は、肥満を呈するレプチン欠損 (*ob/ob*) マウスおよび高脂肪食負荷マウスの肝臓および LSEC では *Ccl2* (MCP-1) の発現が増加していることを見出した。加えて、*Icam1* (ICAM-1)、*Vcam1* (VCAM-1)、*Selp* (P-selectin)、*Sele* (E-selectin) 等の接着因子も LSEC 優位に発現していることを確認した。これより、LSEC が MCP-1 および接着因子の発現亢進を介して、肥満に伴う白血球の誘導と肝実質への浸潤に関与している可能性を見出した。すなわち、肥満では LSEC 由来の MCP-1 の分泌が増加することで白血球の誘導を促進し、続いて炎症細胞と LSEC との間の接着の増強により肝実質への浸潤が促進されている可能性がある。本研究では、肥満に伴う肝糖代謝異常における LSEC の意義を解明することを目的とする。

方法および結果

1. 肥満マウスの肝臓および LSEC におけるケモカインの発現と細胞接着の検討

ob/ob マウスあるいは高脂肪食負荷 (HFD) マウスの LSEC では、CCR-2 のリガンド *Ccl2* (MCP-1) と接着因子 (ICAM-1, VCAM-1, Selectins) の遺伝子発現が増加していた。CD146 抗体を用いて *ob/ob* マウスと対照マウスから LSEC を単離培養し、マイクロアレイ解析を施行したところ、細胞接着、ケモカインシグナル、白血球の transmigration の系が HFD マウス由来の LSEC において有意に enrich されていた (図 1)。これより、肥満においては LSEC における細胞接着及びケモカインシグナルが亢進していることが示唆された。

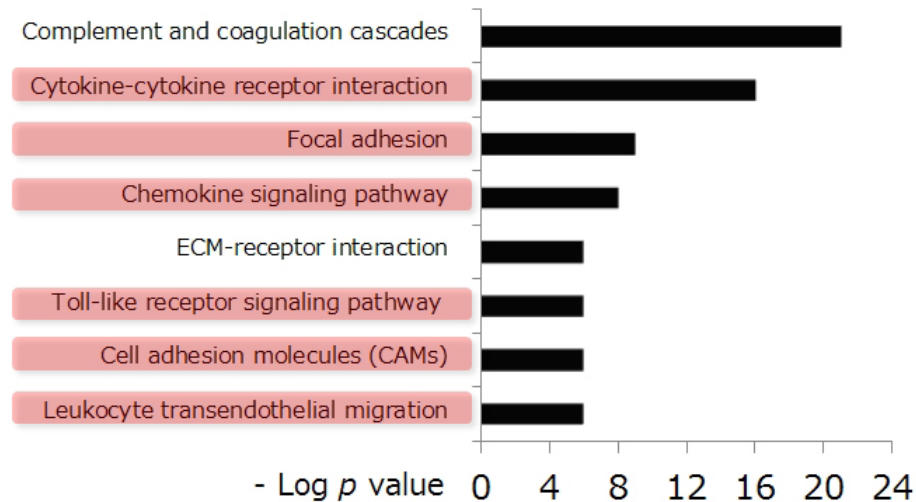


図1. *ob/ob* マウス由来 LSEC のマイクロアレイ解析.

野生型マウス由来 LSEC と比較して, *ob/ob* マウス由来 LSEC において 1.5 倍以上発現が増加した遺伝子群によるパスウェイ解析.

2. 還流型細胞接着実験装置を用いた LSEC と白血球の相互作用の検討

還流型細胞接着実験装置を用いた LSEC と白血球の接着実験を行った. HFD および対照マウスより LSEC を単離し, 専用の還流用チャンバーに培養し, 培地に懸濁した単球 (WEHI274.1 細胞) をシリンジポンプにてチャンバーに還流し, LSEC に接着した単球数を定量評価した. HFD マウスの LSEC では非肥満マウスの LSEC と比較して単球接着が亢進しており, VLA-4 の阻害抗体による前処置により, 単球の接着は有意に抑制された (図2). このことから, 肥満においては VCAM-1/VLA-4 系を介した LSEC と白血球の接着が亢進していることが示唆された.

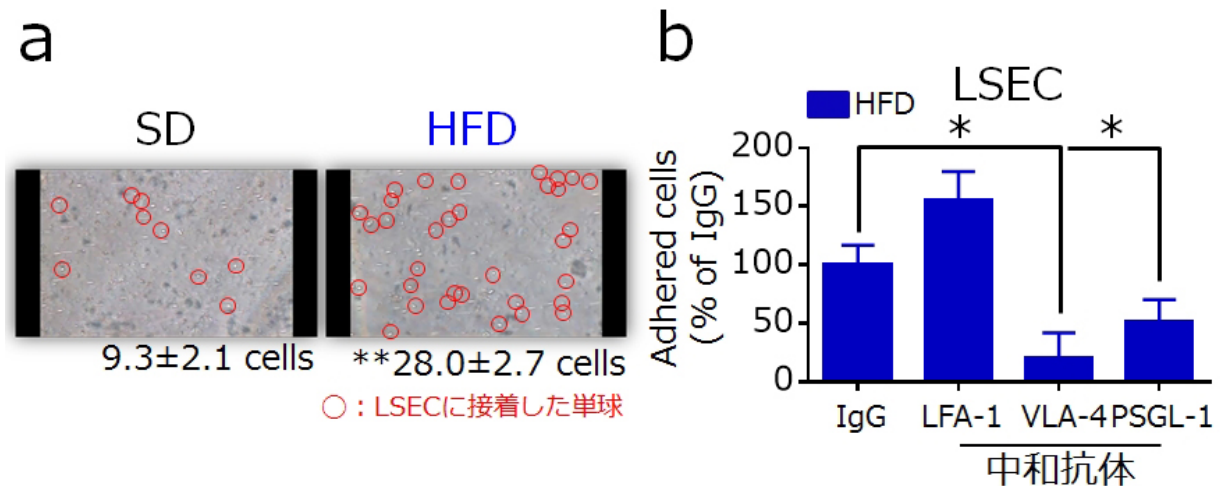


図2. 還流条件における高脂肪食マウス由来 LSEC と単球細胞株との接着実験.

a) 還流条件における通常食 (SD) および高脂肪食 (HFD) 負荷マウス由来培養 LSEC と単球細胞株 (WEHI274.1 細胞) の接着. $n=4$, $p < 0.01$ vs. SD. b) 接着因子リガンド (LFA-1, VLA-4, PSGL-1) に対する中和抗体前処置後の還流条件における HFD 負荷マウス由来 LSEC との細胞接着. 対照 IgG 前処置群の細胞接着を 100% とした. $n=3-4$, $*p < 0.05$ vs. IgG. Non-paired t test.

3. 浸潤白血球優位に発現する接着因子リガンドの同定

肝内には常在性マクロファージである Kupffer 細胞 (KC) が存在し、肥満により活性化されて肝内の炎症を惹起する³⁾。各接着因子には、選択的に結合するリガンドが同定されており、KC と浸潤白血球でリガンドの発現量を比較することで、浸潤白血球で優位に亢進している接着因子-リガンドの組み合わせを推定することができる。HFD マウスの肝非実質細胞からセルソーターで KC (F4/80^{hi}CD11b⁺) および浸潤白血球 (F4/80^{low}CD11b⁺) を得て、代表的な接着因子リガンド *Itga4* (分子名 VLA-4), *Itgal* (LFA-1), *Selel* (ESL-1), *Selplg* (PSGL-1) の遺伝子発現を比較した。結果、VCAM-1 のリガンドである *Itgb1* (VLA-4) のみが KC より浸潤白血球で優位に発現していた。これより、肥満の LSEC と白血球の接着において、VCAM-1/VLA-4 の系が特に活性化されていることが推察された。

4. 肝細胞における Notch シグナルの活性化

浸潤白血球が肝細胞において糖代謝異常を惹起する機序として、細胞接触シグナル Notch に着目した。肝実質細胞と非実質細胞分画中の白血球共通抗原 CD45 陽性細胞の接触共培養実験を施行し、Notch シグナルを介する糖新生関連遺伝子 (*G6pc* および *Pck1*) の発現誘導と糖産生増加が認められた。一方で、トランスウェルを用いた非接触共培養ではこれらの変化は認められず、肝内に浸潤した白血球は細胞接触シグナル Notch を介して肝細胞の糖代謝異常を惹起していると考えられた。

5. 阻害抗体を用いた個体レベルでの検討

2 および 3 の結果から、VCAM-1/VLA-4 系が LSEC と白血球の接着に重要な役割を果たしている可能性が考えられ、10 週間の高脂肪食負荷肥満マウスに抗 VLA-4 阻害抗体を 6 週間腹腔内投与した。体重、脂肪組織重量は対象 IgG 投与群と有意な差を認めなかったが、糖負荷試験による耐糖能およびインスリン抵抗性 (インスリン抵抗性指数 HOMA-R) の有意な改善を認めた。抗 VLA-4 阻害抗体により肝臓での *Ccl2* (MCP-1), *Ccr2* (CCR-2), *Il6* (IL-6), *Tnfa* (TNF- α) の遺伝子発現は有意に減少し、組織学的に肝内への CCR-2 および Gr-1 陽性細胞の浸潤が抑制された (図 3)。これより、肥満において VCAM-1/VLA-4 系が個体レベルのインスリン抵抗性の発症に重要な役割を果たしていることが示された。

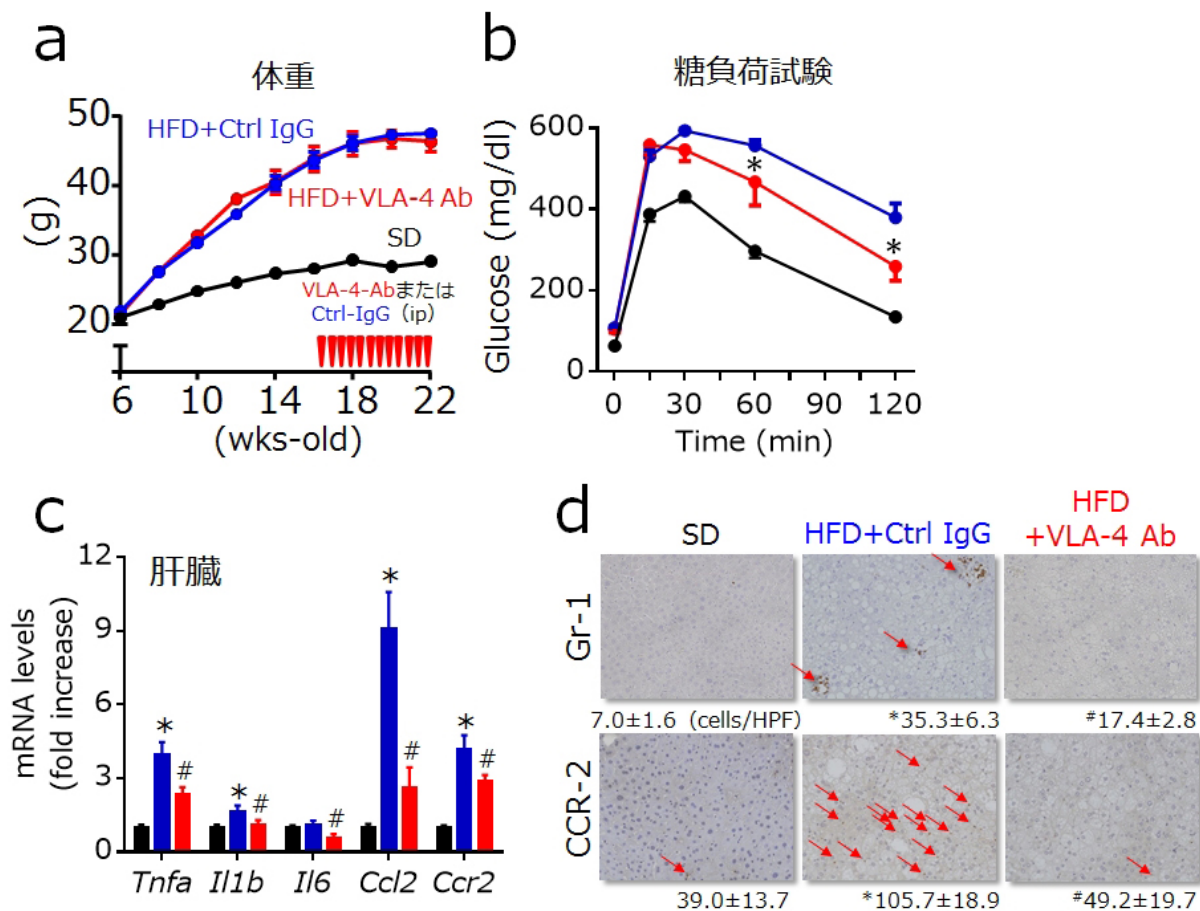


図3. 高脂肪食肥満マウスに対する抗 VLA-4 中和抗体投与.

野生型マウスに対して6週齢より高脂肪食 (HFD) を負荷し、負荷10週後より抗 VLA-4 中和抗体 (VLA-4-Ab) または対照 IgG (Ctrl IgG) を週2回腹腔内注射した。通常食 (SD) マウスとともに (a) 体重測定、(b) 糖負荷試験による耐糖能評価、(c) 定量的 RT-PCR 法による肝臓の遺伝子発現解析、および (d) 肝臓の Gr-1, CCR-2 免疫染色を行った。n=8-14, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. SD, # $p < 0.05$ vs. HFD+Ctrl IgG. Non-paired t test.

考 察

肥満マウスの肝臓では LSEC における MCP-1 の発現が増加しており、白血球の浸潤を促進すると考えられた。白血球は VCAM-1/VLA-4 系を介して LSEC と接着し、肝実質内では肝細胞との細胞接触により Notch シグナルを活性化して肝糖代謝障害を誘導することが示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学先進倫理医学開発学分野の吉田雅幸 (教授)、大坂瑞子 (助教)、出牛三千代 (技術補佐員) である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Obstfeld, A. E., Sugaru, E., Thearle, M., Francisco, A. M., Gayet, C., Ginsberg, H. N., Ables, E. V. & Ferrante, A. W. Jr. : C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes*, **59** : 916-925, 2010.

- 2) Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K. & Kasuga, M. : MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.*, **116** : 1494-1505, 2006.
- 3) Lanthier, N., Molendi-Coste, O., Horsmans, Y., van Rooijen, N., Cani, P. D. & Leclercq, I. A. : Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **298** : G107-G116, 2010.