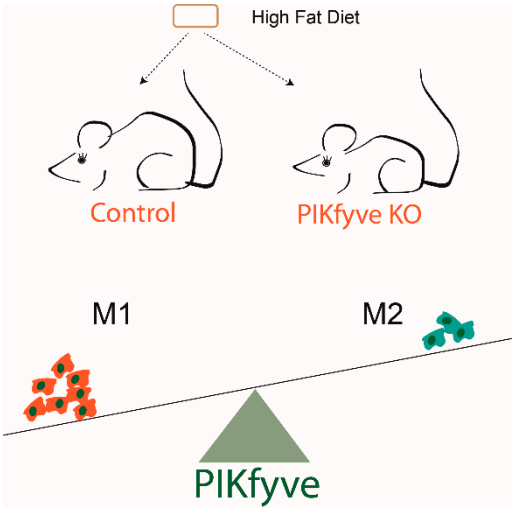
127　肥満炎症抑制を目指したマクロファージの脂質代謝制御	川﨑　拓実

【目的】生体が障害やストレスを受けるたり、病原体に侵入されることにより、自然免疫系の応答が誘導され、サイトカインの産生に伴って生体防御のための炎症応答が誘導される。このような炎症応答が、原因が除去されても何らかの理由により収束せず持続的に慢性化することを慢性炎症と呼んでいる。慢性炎症は多様な疾患に伴っており、ぜんそくやアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患、関節リウマチなどの自己免疫性疾患の要因として挙げられており、さらに近年では肥満も慢性炎症の関わる代表的な疾患として知られている。これまでの我々の研究において、マクロファージのイノシトールリン脂質代謝と炎症に着目して研究をしてきたことから、本研究では肥満炎症抑制を目指したマクロファージの脂質代謝制御を目的とした研究を行った。

【方法】イノシトールリン脂質のリン酸化酵素である PIKfyve は、イノシトールリン脂質のイノシトール環の 5 位の部位をリン酸化することでホスファチジルイノシトール 5 リン酸やホスファチジルイノシトール 3、5 リン酸を産生する。一方、高脂肪食投与による脂肪組織内のマクロファージの炎症が肥満の増悪化に関与することが多数報告されている。そこで、野生型及びマクロファージ特異的 *PIKfyve* 欠損マウスに、高脂肪食を付加することにより肥満を誘導し、組織内に浸潤する免疫細胞を調べることにより、マクロファージの PIKfyve による肥満抑制の詳細な分子メカニズムや作用機序を明らかにした。

【結果】野生型マウス及びマクロファージ特異的 *PIKfyve* 欠損マウスに通常食もしくは高脂肪食投与後の体重の計時変化を計測した。その結果、通常食投与ではでは野生型マウスと *PIKfyve* 欠損マウスの体重は加齢とともに増加するものの、体重差は見られなかった。一方、高脂肪食投与により、野生型マウスは通常食を与えたものよりも優位に体重が増加したが、*PIKfyve* 欠損マウスは体重の増加が抑制されていた。腹腔内の脂肪組織の重量も、野生型マウスは高脂肪食投与後により増加した一方で、高脂肪食投与による *PIKfyve* 欠損マウスの脂肪の蓄積は抑えられていた。腹腔内の脂肪組織に浸潤したマクロファージがどのように PIKfyve により制御を受け、また、マクロファージが慢性炎症をどのように制御をしているかを明らかにするため、脂肪組織内の免疫細胞を解析した。その結果、野生型マウスと *PIKfyve* 欠損マウス間での脂肪組織内に浸潤した T 細胞、NK 細胞、好中球、好酸球、樹状細胞及びマクロファージの割合には変化がなかったが、炎症性マクロファージである M1 マクロファージの割合が野生型マウスに比べ *PIKfyve* 欠損マウスでは減少していることが明らかとなった。以上の結果から、*PIKfyve* 欠損マウスでの肥満は、脂肪組織内に浸潤した M1 マクロファージを制御することにより、抑制された可能性が示唆された。

PIKfyve のマクロファージ分化制御による肥満炎症制御



127. 肥満炎症抑制を目指したマクロファージの脂質代謝制御

川﨑　拓実

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 分子免疫制御

Key words：慢性炎症，PIKfyve，イノシトールリン脂質，肥満，M1 マクロファージ

緒　言

生体が障害を受けたり、病原体に侵入されたりすることにより、自然免疫系の応答が誘導され、サイトカインの産生に伴って生体防御のための炎症が誘導される。このような炎症が、原因が除去されても何らかの理由により収束せず持続的に慢性化することを慢性炎症と呼んでいる。慢性炎症を伴う病気として、ぜんそくやアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患、関節リウマチなどの自己免疫性疾患などが挙げられる。これら慢性炎症に対する治療には、ステロイド系抗炎症剤を用いることが多い。しかし、ステロイドによる炎症抑制は対処療法的に炎症を抑えるだけで原因の解消に至っていないため、より根本的に効果的な治療方法の開発が望まれている。これまでの我々の研究で慢性炎症とマクロファージの脂質代謝の重要性を明らかにしてきた。そこで本研究では、これまで得られた知見をもとに、慢性炎症の抑制のためのマクロファージの脂質代謝制御を目指して研究を行った。

マクロファージは個々の組織に常在し、個別の機能をもつことで病原体の除去や組織の恒常性維持に貢献している［1，2］。組織常在性マクロファージはその機能から大きく 2 つに大別され、炎症抑制性マクロファージ（M2 マクロファージ）は、組織の恒常性維持に寄与している一方、炎症性マクロファージ（M1 マクロファージ）は TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカインを分泌することで炎症の増大を引き起こす［3］。この組織常在性マクロファージは、慢性炎症の発症及び収束に重要な役割を果たすことが明らかとなってきている。組織常在性マクロファージの M1／M2 分化のバランスは健康な状態であれば適切に制御されているが、慢性炎症状態の組織においては、M1 マクロファージが優位になり、より炎症の増悪化が引き起おこされると考えられている。このマクロファージの状態を制御することにより、慢性炎症の収束を促すことができれば、新しい視点での慢性炎症の治療法方法を提案することができると考えられた。

イノシトールリン脂質は細胞内の微量な脂質でありながら、イノシトール環のリン酸化状態により様々な役割をもつ生理活性物質である。これまで、イノシトールリン脂質代謝酵素である PIKfyve のマクロファージ特異的欠損マウスを用いた研究により、肺組織でのマクロファージの分化とアレルギー炎症の関係を明らかにしてきた［4］。また、最近の研究では、これまで慢性炎症との関連についてはほとんど顧みられなかったがん、肥満などの病気でも、慢性炎症が関わっていることが明らかとなってきている。実際に我々の *PIKfyve* 欠損マウスを用いた研究では、野生型及び *PIKfyve* 欠損マウスは、通常食では変化がなかったが、高脂肪食を付加することにより肥満を誘導したところ、野生型マウスでは肥満になったものの *PIKfyve* 欠損マウスでは肥満状態が抑制されていることが明らかとなった。これらの結果は、イノシトールリン脂質の代謝制御によりマクロファージの分化状態を制御することで慢性炎症を制御できる可能性を示唆していたことから、肥満炎症を制御することによるマクロファージの脂質代謝制御を目指して研究を行った。

方法および結果

健康な通常状態の脂肪組織内には、炎症抑制性マクロファージ（M2 マクロファージ）が常在し、脂肪組織の恒常性維持に寄与している一方で、肥満状態になると脂肪組織は肥大化し、肥満状態では脂肪組織内に集積した Th1 細胞が分泌したⅡ型のインターフェロン（IFN-γ）によって活性化された炎症性マクロファージ（M1 マクロファージ）が

集積している。M1 マクロファージは、TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカインを分泌し、インスリンシグナルに影響を与え、インスリン抵抗性を亢進する。好中球に続いて単球も誘引され、脂肪組織内に流入し、炎症性サイトカインをさらに産生することで、脂肪組織内を慢性的な炎症状態にすることが知られている。これまで予備実験として、野生型及び *PIKfyve* 欠損マウスに高脂肪食（High Fat Diet（HFD））を付加することにより肥満を誘導したところ、通常食（Normal Control Diet（NCD））では変化がなかったものの野生型マウスでは肥満を誘導できたものの、*PIKfyve* 欠損マウスでは肥満状態が抑制されていることが明らかとなった（図 1）。

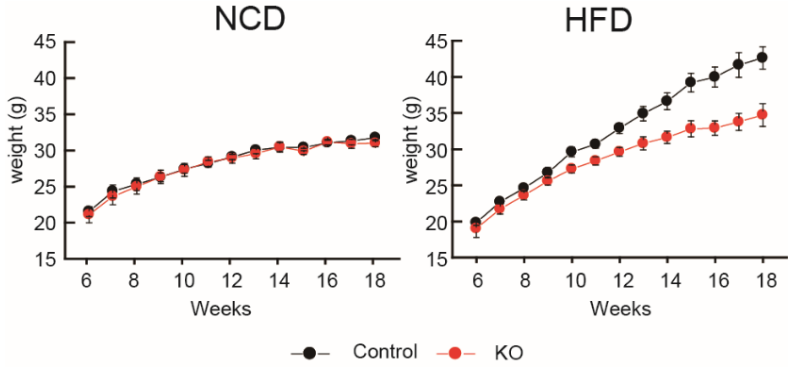


図 1. HCD、HFD 投与時の経時的な体重変化

6 週令の野生型（Control）及び *PIKfyve* 欠損（KO）マウスに通常食（Normal Control Diet（NCD））（左）及び高脂肪食（High Fat Diet（HFD））（右）を与え、継時的な体重の変化を計測した。

un-paired t-test、*P＜0.05。

食事誘導性の肥満が起こることで、脂肪細胞の肥大化に伴う内臓脂肪の肥大化が知られている。そこで、Control 及び *PIKfyve* 欠損マウスの卵巣周囲脂肪組織を採取し、重量を計測した。その結果、ND を摂餌させた場合では脂肪組織の大きさ、重量に差は見られなかった（図 2 左）。一方、HFD を摂餌させた場合では、野生型マウスで脂肪組織が肥大化していたのに対し、*PIKfyve* 欠損マウスにおいては、肥大化が抑制されていた（図 2 右）。次に、HFD 摂餌後の *PIKfyve* 欠損マウスにおいて、脂肪細胞の肥大化が起きているかを確認するために、パラフィンにより作製した脂肪組織切片の H&E 染色を行った。ND を摂餌させた場合は、野生型及び *PIKfyve* 欠損マウスの脂肪細胞の大きさに差は見られなかった。HFD を摂餌させた場合では、野生型マウスにおいて脂肪細胞が肥大化しているのに対し、*PIKfyve* 欠損マウスでは肥大化が抑えられていることが観察された。

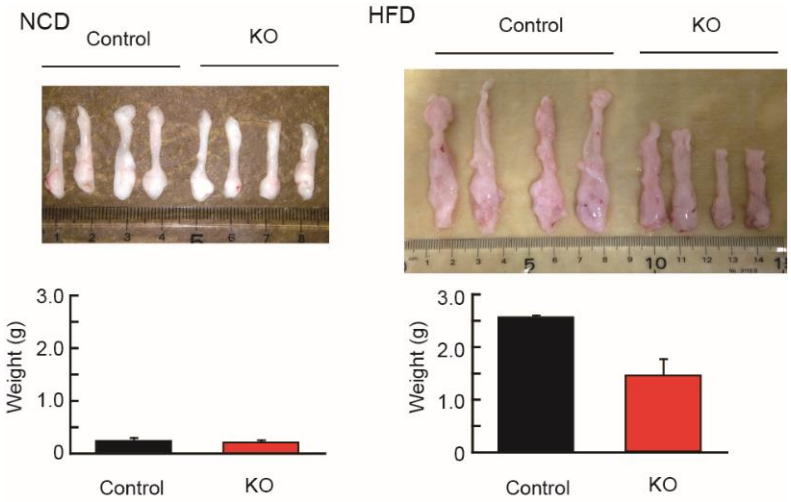


図 2. NCD、HFD 投与後の腹腔内の脂肪組織

6 週令の野生型（Control）及び *PIKfyve* 欠損（KO）マウスに通常食（Normal Diet（ND））（左）及び高脂肪食（High Fat Diet（HFD））（右）を与え、腹腔内の脂肪組織の大きさと重量を測定した。

un-paired t-test、＊P＜0.05。

PIKfyve 欠損マウスにおける肥満誘導の抑制と免疫細胞の関与を明らかにするため、脂肪組織内の炎症反応に関与することが知られている好酸球（Eosinophils：$CD45^+CD11b^+SiglecF^+$）、好中球（Neutrophils：$CD45^+CD11b^+Ly6G^+$）、樹状細胞（Dendritic cells：$CD45^+CD11b^+CD11c^+$）、T cells（$CD45^+CD11b^-TCR\beta^+$）、NK cells（Natural killer cells：$CD45^+CD11b^-NK1.1^+$）、マクロファージ（Macrophages：$CD45^+CD11b^+F4/80^+$）の分布をフローサイトメトリーを用いて解析した（図 3）。その結果、NCD 及び HFD を摂餌させたマウスでは、野生型マウスと *PIKfyve* 欠損マウスの間でこれら免疫細胞の割合に有意な差は認められなかった（図 3）。

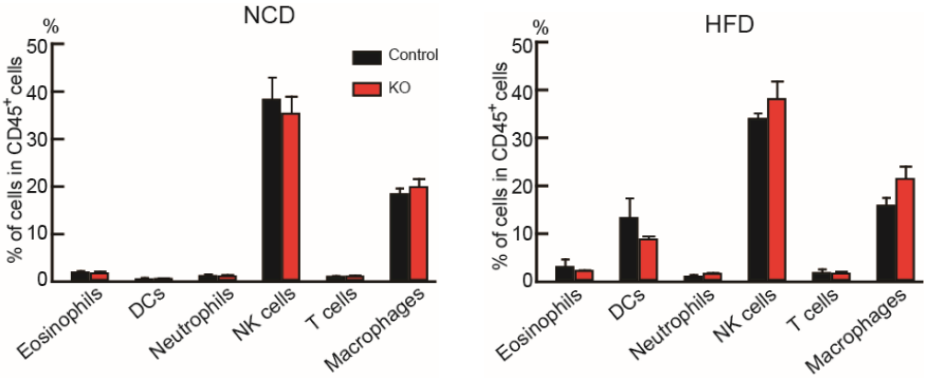


図 3. 脂肪組織に浸潤した免疫細胞の解析

6 週令の野生型（Control）及び *PIKfyve* 欠損（KO）マウスに通常食（Normal Diet（ND））（上）及び高脂肪食（High Fat Diet（HFD））（下）を与え、Control および *PIKfyve* KO マウスの脂肪組織を採取し、浸潤している好酸球（Eosinophils：$CD45^+CD11b^+SiglecF^+$）、好中球（Neutrophils：$CD45^+CD11b^+Ly6G^+$）、樹状細胞（Dendritic cells：$CD45^+CD11b^+CD11c^+$）、T cells（$CD45^+CD11b^-TCR\beta^+$）、NK cells（Natural killer cells：$CD45^+CD11b^-NK1.1^+$）、マクロファージ（Macrophages：$CD45^+CD11b^+F4/80^+$）の割合をフローサイトメトリーで解析した。

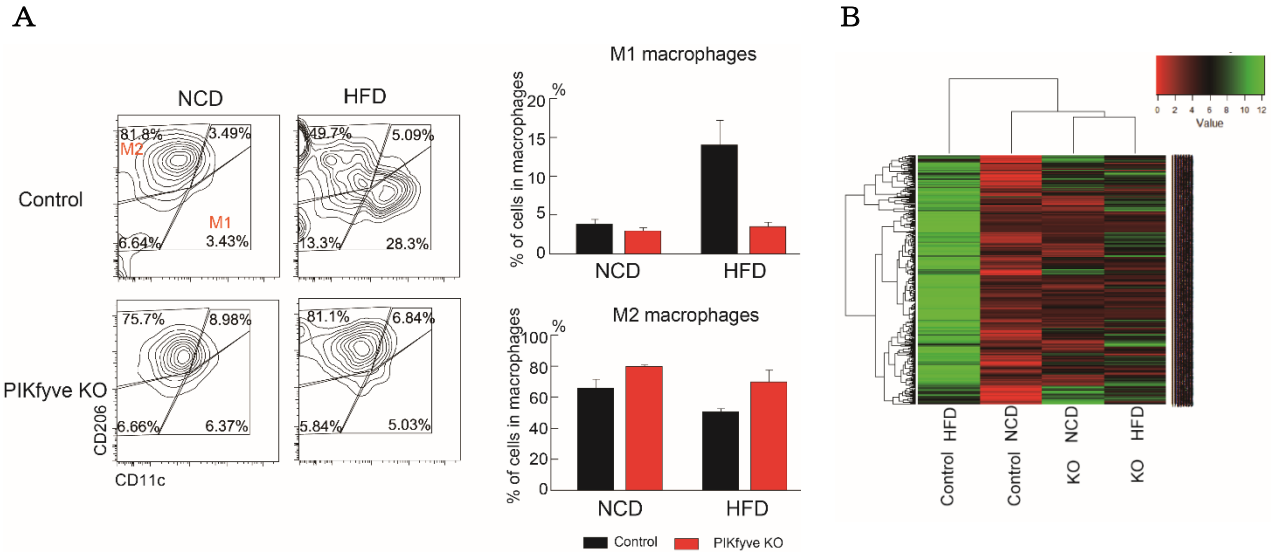


図 4. 脂肪組織に浸潤したマクロファージの解析

A) ND および HFD を摂餌させた Control、*PIKfyve* KO のオスマウスの脂肪組織内マクロファージを M1／M2 マクロファージの分画に分けた図を示す。$CD45^+CD11b^+F4/80^+$のマクロファージ分画とした後、$CD11c^+CD206^-$を示す細胞分画を M1 マクロファージ、$CD11c^-CD206^+$を示す細胞分画は M2 マクロファージを表している。

B) ND および HFD を摂餌させた Control、*PIKfyve* KO のマウスの脂肪組織からマクロファージを単離し、遺伝子発現をマイクロアレイにより調べた。

次に、マクロファージをさらに詳しく調べるため、脂肪組織内マクロファージを $CD45^+CD11b^+F4/80^+$でゲートした後、さらに CD11c と CD206 を用いて M1（$CD45^+CD11b^+F4/80^+CD11c^-CD206^+$）および M2（$CD45^+CD11b^+F4/80^+CD11c^+CD206^-$）マクロファージとして分離しその割合を解析した（図 4)。M1 マクロファージは HFD による脂肪組織内に誘導されることがこれまでの研究で示されているが、本研究でも、野生型マウスにおいて M1 マクロファージ割合が増加していることが分かった一方、*PIKfyve* 欠損マウスでは HFD を摂餌させた場合特に、M1 マクロファージの増加が抑制されていた (図 4A)。表面抗原を用いた M1／M2 マクロファージの分離では HFD により野生型では M1 マクロファージが増加するのに対して、*PIKfyve* 欠損マウスでは M1 マクロファージの増加が抑制されていた。そこで、次に脂肪組織内のマクロファージの遺伝子発現を網羅的に調べることにより、マクロファージによる慢性炎症について検証した（図 4B)。その結果、野生型マウスでは HFD の投与によりマクロファージの遺伝子発現が NCD に比べ顕著に増減する遺伝子が 100 程度あるが、それら遺伝子の発現の増減は *PIKfyve* 欠損マウス由来マクロファージでは見られなかった。また、炎症性マーカーやマクロファージの分化マーカーの詳細な解析により、*PIKfyve* 欠損　マウス由来マクロファージは M1 マクロファージへの分化が抑制されていることが示唆された。

考　察

NCD の摂餌時の *PIKfyve* 欠損マウスは、野生型マウスと同様の体重だった一方、HFD の摂餌時では野生型は顕著な体重増加が見られたものの、*PIKfyve* 欠損マウスの体重増加が抑制されていた（図 1)。また、腹腔内に蓄積した脂肪組織の大きさ及び重さも野生型に比べ *PIKfyve* 欠損マウスでは抑制されおり、組織検査によって脂肪組織の肥大化の抑制が起きていることが明らかとなった（図 2)。このことから、マクロファージ特異的 *PIKfyve* の欠損により HFD 摂餌による食事誘導性肥満が抑制されることが明らかとなった。次に *PIKfyve* 欠損マウスにおける肥満抑制と、免疫細胞との関与を明らかにするため、脂肪組織内へと浸潤する免疫細胞の変化を調べたところ、マクロファージや NK 細胞といった脂肪組織の炎症に関与する免疫細胞の割合には大きな変化が見られなかった（図 3)。しかし、脂肪組織内マクロファージの詳細な解析では、野生型マウスでは ND に比べ HFD 摂餌により M1 マクロファージの割合が増加し、*PIKfyve* 欠損マウスでは増加しないことが分かった。一方で、M2 マクロファージは、Control マウスで減少が見られたのに対し、*PIKfyve* 欠損マウスでは減少は見られなかった（図 4)。また、網羅的な発現解析でも、野生型マウス由来のマクロファージでは多くの炎症関連遺伝子が HFD により発現誘導していたが、*PIKfyve* 欠損マウス由来マクロファージはそれら遺伝子発現が抑制されており、脂肪組織内の *PIKfyve* 欠損マウスの M1 マクロファージへの分化が抑制されていることが示唆された（図 4)。

本研究で、PIKfyve は脂肪組織内におけるマクロファージの制御因子、特に M1／M2 マクロファージの分化過程への関与が示唆された。脂質代謝酵素である PIKfyve は産生脂質であるホスファチジルイノシトール 5 リン酸もしくはホスファチジルイノシトール 3，5 リン酸の産生制御を通じて、慢性炎症の際のマクロファージの分化を制御していることが示唆された。しかし、マクロファージ特異的な *PIKfyve* の欠損がどのようにマクロファージの分化に影響を与えているのか、その分子機構は不明である。これまでの先行研究で、PIKfyve はウイルス感染時においてイノシトールリン脂質のリン酸化を介して、IRF ファミリー転写因子の一つである IRF3 を活性化することが報告していることから [4]、PIKfyve は転写因子の機能を直接的もしくは間接的に制御することで、マクロファージの分化制御を行っていると考えられる。転写因子 IRF3 の同じファミリーに属する IRF5 は、M1 マクロファージへの分化誘導に重要であることが報告されていることから、今後、IRF5 がどのように PIKfyve により制御を受けるのかに着目し研究を行う。また、慢性炎症制御に PIKfvye が関与することが示されたことから、肥満をはじめとする慢性炎症の関わる疾患において PIKfvye の阻害剤が治療効果を示すのか検証を行う。

共同研究者・謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学大学院先端科学研究科分子免疫制御学研究室の河合太郎教授のもと行った。

文　献

1) Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., Chen, H.. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of clinical investigation, 112, 1821-1830. (2003)　PMID: 14679177 DOI: 10.1172/JCI19451

2) Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W.. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. The Journal of clinical investigation, 112(12), 1796-1808. (2003) PMID: 14679176 DOI: 10.1172/JCI200319246

3) Fernando O. Martinez and Siamon Gordon The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment F1000Prime Rep. 6 13 (2014)　PMID: 24669294 DOI: 10.12703/P6-13

4) Kawasaki T, Ito K, Miyata H, Akira S, Kawai T. Deletion of PIKfyve alters alveolar macrophage populations and exacerbates allergic inflammation in mice. EMBO J. 2017 Jun 14;36(12):1707-1718. PMID: 28533230 DOI: 10.15252/embj.201695528.