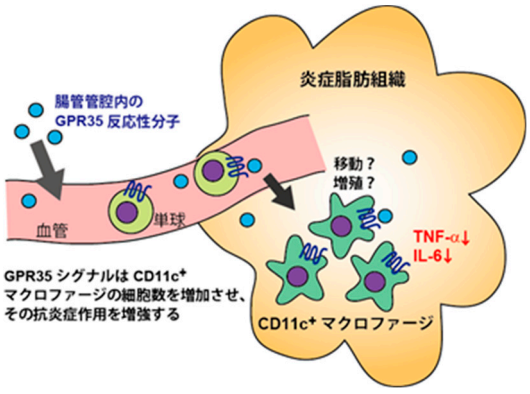
27　マクロファージ系細胞上のGPCRによる肥満制御	梅本　英司

【目的】現在社会において肥満症は健康を脅かす要因として世界的な問題となっている。肥満の基盤病態として慢性炎症が知られ、肥満の脂肪組織では組織そのものが炎症性変化を示す。肥満に伴う脂肪組織炎症にはマクロファージなど自然免疫系の細胞が重要な役割を果たすことが知られる。脂肪組織マクロファージ（ATM）には、複数の細胞集団が存在することが報告されており、個々のマクロファージ集団が異なる肥満病態に関与すると考えられている。GPR35 はキヌレン酸等などの代謝分子に結合する G 蛋白質共役型受容体（GPCR）ファミリー分子である。GPR35 はキヌレン酸や 5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）などの代謝分子に結合することが知られる。近年、GPR35 シグナルは脂肪細胞において、βアドレナリン受容体シグナルを促進することで、エネルギー消費を増加させることが報告された。一方で、GPR35 は白血球に高発現するが、ATM における GPR35 の生理的役割については不明な点が多いことから、本研究では ATM における GPR35 シグナルの役割および肥満時の GPR35 結合分子を解析した。

【方法】野生型マウスおよび *GPR35* 欠損マウスに高脂肪食を 6 週間投与し、白色脂肪組織（体脂肪および皮下脂肪）における ATM 集団をフローサイトメトリーにより解析した。また、このときの脂肪組織におけるサイトカイン産生を定量 PCR により評価した。食物や腸内細菌由来の成分に GPR35 反応性分子が含まれることを想定し、大腸内容物に含まれる GPR35 反応性分子を、種々のクロマトグラフィーを用いて精製した。

【結果】ATM は CD11c および Tim4 の発現を指標に $CD11c^{+}Tim4^{-}$マクロファージ、$CD11c^{-}Tim4^{-}$マクロファージ、$CD11c^{-}Tim4^{+}$マクロファージに分けられる。定量 PCR の結果、これらの集団はいずれも *gpr35* 遺伝子を発現していた。野生型マウスおよび *GPR35* 欠損マウスに高脂肪食を投与した結果、高脂肪食を投与した野生型マウスでは、内臓脂肪および皮下脂肪において $CD11c^{+}Tim4^{-}$マクロファージが増加したが、*GPR35* 欠損マウスではこの増加は殆ど認められなかった。$CD11c^{+}Tim4^{-}$マクロファージは炎症性集団としての報告がある一方、抗炎症性分子を発現するという一見相反する知見も報告されている。高脂肪食を投与したマウスの脂肪組織における炎症性サイトカインの発現を評価したところ、*GPR35* 欠損マウスで *tnfa* および *il6* 遺伝子の発現上昇が認められた。したがって、GPR35 シグナルは $CD11c^{+}Tim4^{-}$マクロファージの動員もしくは増殖を促進し、炎症性サイトカイン産生を制御することにより、脂肪組織の炎症反応を抑制する可能性が考えられた。$CD11c^{+}$マクロファージは肥満発症後期に死んだ脂肪細胞を除去して、肥満に防御的に作用する metabolically activated マクロファージに近い遺伝子発現を示すことから、今後、$CD11c^{+}Tim4^{-}$マクロファージにおける GPR35 シグナルの役割について、更に解析を行う予定である。また、食物や腸内細菌由来の成分に GPR35 反応性分子が含まれることを想定し、大腸内容物から調製した抽出物における GPR35 反応性を検討したところ、水溶性画分に GPR35 に対する反応性が認められた。現在、この GPR35 反応性分子の精製を段階的に行っているが、現時点でこの分子は既知リガンドのキヌレン酸や 5-HIAA と異なる分子である可能性が高いと考えられた。以上の知見から、ATM における GPR35 を介したシグナルは肥満病態を抑制する可能性があり、その詳細な分子機構については今後の更なる解析が求められる。

作業仮説



27. マクロファージ系細胞上のGPCRによる肥満制御

梅本　英司

静岡県立大学 薬学研究院 免疫微生物学教室

Key words : G タンパク共役型受容体，脂肪組織，マクロファージ，代謝分子

緒　言

現在社会において肥満症は健康を脅かす要因として世界的な問題となっている。肥満の基盤病態として慢性炎症が知られ、肥満の脂肪組織では組織そのものが炎症性変化を示す。肥満に伴う脂肪組織炎症にはマクロファージなど自然免疫系の細胞が重要な役割を果たすことが知られる。特にケモカイン受容体 CCR2 を欠損するマウスでは骨髄由来単球の脂肪組織への移入が抑制され、肥満に伴う炎症指標が減少する［1］。一方、近年、脂肪組織マクロファージ（ATM）のなかでもTim4 を発現する組織常在性マクロファージはPDGF／VEGF ファミリー分子 PDGFcc を産生することで脂肪細胞のエネルギー蓄積を促進することが報告された［2］。このように脂肪組織には複数のマクロファージ集団が存在し、個々のマクロファージ集団が肥満の病態に異なる役割を果たしている。近年、ATM のシングルセル解析により、脂肪組織の単球・マクロファージ集団は少なくとも 5 つのサブセットに分けられると報告された［3］。この中には、血管関連 ATM（VAM）（VAM1 : $Tim4^{+}MHC\,class\,II^{-}$、VAM2 : $Tim4^{-}MHC\,class\,II^{+}$）、preVAM（VAM の前駆細胞）、$CD11c^{+}$マクロファージ、単球が含まれる。これらの細胞集団のなかでも、高脂肪食の摂取により VAM1 や $CD11c^{+}$ マクロファージが顕著に増加する［3］。

GPR35 はキヌレン酸等などの代謝分子に結合する G 蛋白質共役型受容体（GPCR）ファミリー分子である。近年、*GPR35* を欠損したマウスは肥満を示すことが報告された。脂肪細胞において、GPR35 を介したシグナルはβアドレナリン受容体シグナルを促進することで、エネルギー消費を増加させると考えられる［4］。一方、GPR35 は白血球上に高発現するが、脂肪組織のマクロファージにおける GPR35 の生理的役割については不明な点が多い。また、キヌレン酸は GPR35 に結合することが報告されるが、その結合定数は必ずしも高くない。最近、セロトニンの代謝産物 5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）が GPR35 に結合し、好中球の遊走を促進することが示されたが、肥満時における GPR35 反応性分子は不明である［5］。そこで、本研究では、ATM における GPR35 シグナルの役割および肥満時の GPR35 結合分子について検討を行った。

方　法

1. マウスを用いた解析

GPR35 欠損マウスは、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。具体的には、*gpr35* に相補的なガイド RNA および Cas9 酵素を共発現する発現ベクターをマウス受精卵へ導入し、受精卵を偽妊娠マウスに移植した。産まれた仔マウスのゲノム DNA をスクリーニングして、*gpr35* 遺伝子の一部を欠損するマウスを得た。

高脂肪食として HFD60（オリエンタル酵母、脂肪分をカロリー比で 60%含む）を使用した。生後 4 もしくは 5 週で離乳した後、HFD60 を 6 週間、摂取させて解析に用いた。

2. 脂肪組織の白血球調製

体脂肪として雄の精巣上体部の脂肪（epididymal fat）を、皮下脂肪として鼠径部の脂肪（inguinal fat）を用いた。マウスから摘出した脂肪組織をリベラーゼ TM および DNase I 中で細切し、37℃で 45 分間処理した。消化しきれなかった組織片にシリンジの内筒を押し当て優しくホモジェナイズした。Percoll（30%／70%）処理により界面の細胞

回収し、フローサイトメトリー解析に使用した。

3. GPR35 反応性分子の精製

大腸内容物に超純水を加えてホモジェナイズし、フェノール・クロロホルム抽出によって水溶性画分を得た。水溶性画分を陰イオン交換カラム（HiTrap Q HP）によって中性・塩基性画分と酸性画分に分離した。さらに酸性画分を Sephadex™ LH-20 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって分画化し、各画分における GPR35 反応性を評価した。GPR35 反応性はβ-arrestin の GPCR への recruitment を指標とした。この検出系は、発光タグである BiT タンパク質の小サブユニット（SmBiT）を GPR35 に付加し、大サブユニット（LgBiT）を付加したβ-arrestin が GPCR に recruit すると、BIT タンパク質が会合して発色するしくみを利用している。HEK293 細胞に GPR35-SmBiT およびβ-arrestin-LgBiT を一過性に発現させた後、試料を添加し、BiT タンパク質の発光レベルよって、GPR35 反応性を評価した。

結果および考察

1. *GPR35* の欠損が高脂肪食投与時の脂肪組織マクロファージに与える影響

末梢血の白血球集団では、*gpr35* 遺伝子は Ly6C$^+$単球および Ly6C$^-$単球で選択的に発現が認められる（図 1a）。そこで ATM 細胞集団における *gpr35* 遺伝子の発現を解析した。そこで、CD45$^+$Ly6C^{low} 7AAD$^-$F4/80$^+$マクロファージを CD11c および Tim4 の発現を指標に 3 つの集団をソーティングした。CD11c$^+$Tim4$^-$マクロファージは単球由来のマクロファージで CCR2 依存的に脂肪組織に移動する。CD11c$^-$Tim4$^-$マクロファージは組織常在性でこの一部に VAM1（MHC class Ⅱ$^+$）が含まれる。CD11c$^-$Tim4$^+$マクロファージは組織常在性で、VAM2 が含まれる。この細胞集団は PDGFcc を産生することで、脂肪細胞の脂肪蓄積を促進する。定量 PCR の結果、これらのマクロファージ集団はいずれも少なくとも血中の単球と同程度に *gpr35* を発現していた（図 1b）。

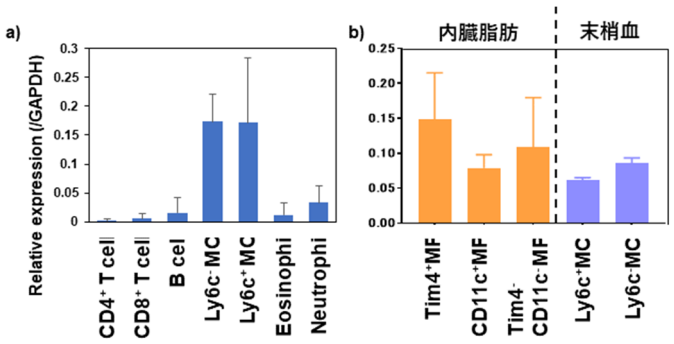


図 1. ATM 集団における GPR35 の発現

各細胞集団における *gpr35* 遺伝子の発現を定量 PCR により解析した。a）末梢血中の白血球集団、b）脂肪組織におけるマクロファージ集団。MC：単球、MF：マクロファージ。

次に、野生型マウスおよび *GPR35* 欠損マウスに高脂肪食を 6 週間与え、これらマクロファージ集団の細胞数を評価した。高脂肪食を投与した野生型マウスでは、内臓脂肪及び皮下脂肪のいずれにおいても CD11c$^+$Tim4$^-$マクロファージの増加が認められたが、この増加は *GPR35* 欠損マウスで認められなかった（図 2）。VAM1（CD11c$^-$Tim4$^-$ MHC class Ⅱ$^+$）も同様に高脂肪食投与により野生型マウスで増加し、*GPR35* の欠損により減少する傾向があったが、これまでのところ、有意差は認められなかった（data not shown）。他のマクロファージ集団では *GPR35* の欠損による影響は認められなかった。

CD11c$^+$Tim4$^-$マクロファージは炎症性の集団として報告される一方、IL-10 など抗炎症性分子を発現するという一見相反する知見も報告されている [3]。高脂肪食を投与したマウスの脂肪組織におけるサイトカインの発現を評価したところ、*GPR35* 欠損マウスで *tnfa* および *il6* の発現上昇が認められた。一方、炎症性ケモカイン *ccl2* 遺伝子の発現に

変化はなかった（図 3）。したがって、GPR35 シグナルは CD11c^{+}Tim4^{-}マクロファージの動員もしくは増殖を促進し、炎症性サイトカインの産生を制御することにより、脂肪組織における炎症反応を抑制する可能性が考えられた。

既報の遺伝子発現解析では、CD11c^{+}Tim4^{-}マクロファージは、M1 マクロファージと異なる細胞集団と考えられ、代謝活性（metabolically activated）マクロファージに近い遺伝子発現を示す［3］。このマクロファージ集団は、インスリン、グルコース、パルミチン酸により誘導される集団で、肥満発症初期では炎症の増悪に作用するが、肥満発症後期ではリソソームを介したエンドサイトーシス経路が活性化することで死んだ脂肪細胞の除去を行う［6］。今後、CD11c^{+}Tim4^{-}マクロファージにおける GPR35 シグナルがどのように脂肪組織の代謝および炎症を制御するか、更なる解析が必要である。

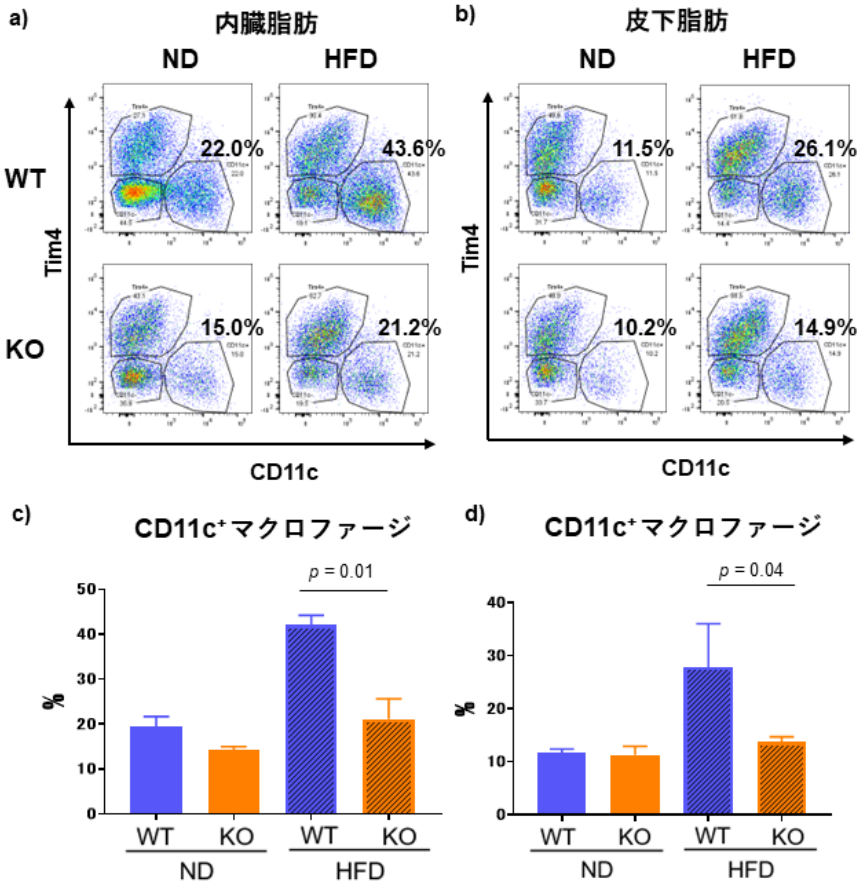


図 2. *GPR35* 欠損マウスにおける各 ATM 集団細胞の割合

野生型マウス（WT）および *GPR35* 欠損マウス（KO）に 6 週間高脂肪食を投与して、脂肪組織におけるマクロファージ集団をフローサイトメトリーで解析した。

a、c）内臓脂肪、b、d）皮下脂肪。a）および b）は 7AAD^{-}CD45^{+}Ly6C^{low} F4/80^{+}マクロファージの各細胞集団、c）および d）は CD11c^{+}Tm4^{-}マクロファージの割合（n=3）。

ND：通常食、HFD：高脂肪食。有意差検定は Student's t-test により行った。

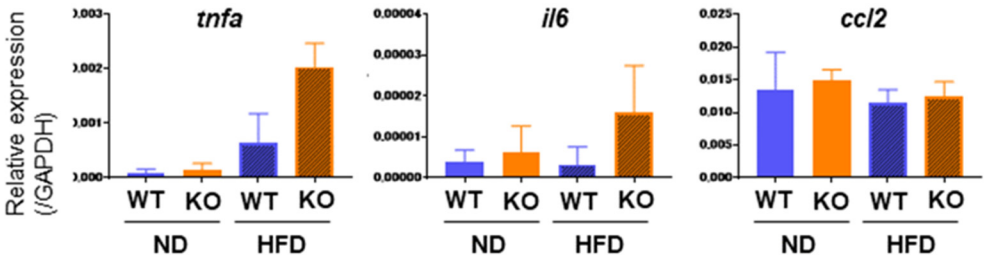


図 3. 脂肪組織における炎症サイトカイン、ケモカインの発現

野生型マウスおよび *GPR35* 欠損マウスに高脂肪食を投与し、内臓脂肪における各遺伝子発現を定量 PCR により解析した（*n*=3）。ND：通常食、HFD：高脂肪食。

2. 腸管内容物に含まれる GPR35 反応性分子の探索

次に、高脂肪食投与時に ATM に作用する GPR35 反応性分子について検討を行った。食物や腸内細菌由来の成分に GPR35 反応性分子が含まれることを想定し、大腸内容物をフェノール・クロロホルム処理によって脂溶性画分および水溶性画分に分離したところ、水溶性画分に GPR35 反応性が強く認められた。水溶性画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより、中性・塩基性画分と酸性画分に分離したところ、酸性画分に GPR35 反応性が検出され、この酸性画分をさらにゲルろ過クロマトグラフィーによって分子量で分離したところ、GPR35 反応性画分が得られた（図 4）。この画分に 5-HIAA は殆ど含まれておらず、一方、キヌレン酸は HPLC の溶媒に殆ど溶解しなかったことから、報告者が分離を進めている GPR35 結合性分子は、これら既知の GPR35 リガンドと異なる可能性が考えられる。今後、腸管内容物に含まれる GPR35 結合性分子の同定を行い、ATM における生理的役割について検討を行う予定である。

以上の知見から、ATM における GPR35 を介したシグナルは、肥満病態を抑制する可能性があり、その詳細な分子機構については今後の更なる解析が求められる。

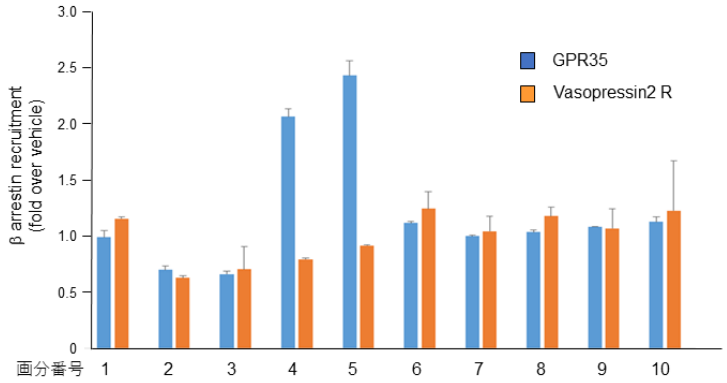


図 4. 腸管内容物に含まれる GPR35 反応性分子の探索

大腸内容物から抽出した水溶性画分をイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、各画分の GPR35 反応性を評価した（*n*=3）。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院薬学研究科分子細胞生物学研究室の井上飛鳥博士である。

文　献

1) Ito A, Suganami T, Yamauchi A, Degawa-Yamauchi M, Tanaka M, Kouyama R, Kobayashi Y, Nitta N, Yasuda K, Hirata Y, Kuziel WA, Takeya M, Kanegasaki S, Kamei Y, Ogawa Y.J Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. Biol Chem. 2008 Dec 19;283(51):35715-23. doi: 10.1074/jbc.M804220200.

2) Cox N, Crozet L, Holtman IR, Loyher PL, Lazarov T, White JB, Mass E, Stanley ER, Elemento O, Glass CK, Geissmann F. Diet-regulated production of PDGFcc by macrophages controls energy storage. Science. 2021 Jul 2;373(6550):eabe9383. doi: 10.1126/science.abe9383.

3) Silva HM, Báfica A, Rodrigues-Luiz GF, Chi J, Santos PDA, Reis BS, Hoytema van Konijnenburg DP, Crane A, Arifa RDN, Martin P, Mendes DAGB, Mansur DS, Torres VJ, Cadwell K, Cohen P, Mucida D, Lafaille JJ. Vasculature-associated fat macrophages readily adapt to inflammatory and metabolic challenges. J Exp Med. 2019 Apr 1;216(4):786-806. doi: 10.1084/jem.20181049.

4) Agudelo LZ, Ferreira DMS, Cervenka I, Bryzgalova G, Dadvar S, Jannig PR, Pettersson-Klein AT, Lakshmikanth T, Sustarsic EG, Porsmyr-Palmertz M, Correia JC, Izadi M, Martínez-Redondo V, Ueland PM, Midttun Ø, Gerhart-Hines Z, Brodin P, Pereira T, Berggren PO, Ruas JL. Cell Metab. Kynurenic Acid and Gpr35 Regulate Adipose Tissue Energy Homeostasis and Inflammation2018 Feb 6;27(2):378-392.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.01.004.

5) De Giovanni M, Tam H, Valet C, Xu Y, Looney MR, Cyster JG. GPR35 promotes neutrophil recruitment in response to serotonin metabolite 5-HIAA. Cell. 2022 Mar 17;185(6):1103-1104. doi: 10.1016/j.cell.2022.03.003.

6) Coats BR, Schoenfelt KQ, Barbosa-Lorenzi VC, Peris E, Cui C, Hoffman A, Zhou G, Fernandez S, Zhai L, Hall BA, Haka AS, Shah AM, Reardon CA, Brady MJ, Rhodes CJ, Maxfield FR, Becker L. Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity。 Cell Rep. 2017 Sep 26;20(13):3149-3161. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.096.