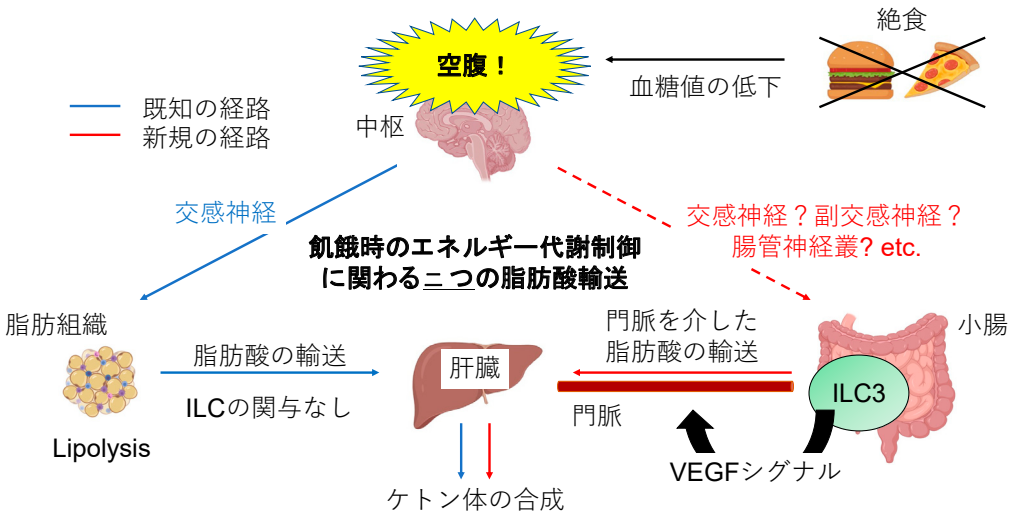
139　飢餓時の代謝制御における免疫系の役割を明らかにする	三澤　拓馬

【目的】飢餓時における代謝系と免疫系の関係を体系的に捉えた研究はほとんど存在しない。したがってこの部分に焦点を当て研究を展開することで、代謝系を適切に制御する上での新たな視点が得られるのではないかと考えた。飢餓状態を実験的に再現する上で絶食試験は有効である。絶食によって体内の糖質レベルが低下すると、肝臓は脂肪酸を基質にケトン体と呼ばれる代謝産物を合成し、末梢のエネルギー源として分配する。予備検討の結果、小腸常在型の免疫細胞である3型自然リンパ球（ILC3）を欠損したマウスはケトン体の合成能が低く、絶食時の活動量も野生型マウスに比べて有意に少ないことが明らかとなった。そこで本研究はILC3を介したケトン体合成制御機構の全容解明を目指した。

【方法】絶食前後で C57BL/6N 雄マウスから血液や小腸の細胞を調製し、リピドミクス解析や single cell RNA-sequence 解析を実施することでケトン体合成系における ILC3 の作用点を特定した。

【結果】絶食時、脂肪組織では lipolysis（脂肪分解）が誘導され、多量の脂肪酸が血流を介して肝臓に輸送される。このことからケトン体の合成は脂肪分解の程度に強く依存すると考えられてきたが、その過程に ILC3 の関与は見出せなかった。小腸で吸収された脂肪酸の一部は門脈を通じて肝臓に直接輸送される。検討の結果、ILC3 はこの経路に作用しケトン体の合成を促進することが明らかとなった。具体的なメカニズムとしては、まず飢餓に応じて活性化した ILC3 が血管透過性促進因子である Vascular endothelial growth factor-A（VEGF-A）を産生する。通常、小腸で吸収された脂肪酸の多くはリンパ管を経由して末梢に運ばれるが、VEGF-A の働きにより小腸の血管透過性が高まると、脂肪酸がリンパ管だけでなく門脈にも流れ込みやすい状況が生まれる。その結果、門脈を通じて脂肪酸が肝臓に活発に輸送され、ケトン体の基質として利用される（下図）。つまり飢餓時には、あらかじめ体内に蓄えていた脂肪酸（脂肪組織由来の脂肪酸）だけでなく、ILC3 の補助の下、体外から摂取した脂肪酸（小腸で吸収した脂肪酸）も余すことなくかき集めてケトン体の合成に利用している。絶食に起因したエネルギー不足に速やかに適応するためには、これら二つの経路が同時に機能することが重要だと考えられる。

ILC3 を介した新規ケトン体合成制御機構の概略図



139. 飢餓時の代謝制御における免疫系の役割を明らかにする

三澤　拓馬

理化学研究所 生命医科学研究センター 免疫細胞システム研究チーム

Key words：ケトン体，脂肪酸，ILC3，門脈，血管透過性

緒　言

飢餓は発展途上国だけでなく、嗜好や食生活スタイルにより先進国でも問題となっている。そのため、これまで注目されてきた栄養素の「過」に加えて「不足」が生体に及ぼす影響を正確に理解することは健康寿命延伸の観点から重要である。宿主防御を本来の役割とする免疫系は、代謝系と有機的なクロストークを展開することが近年の研究から明らかとなってきた。免疫系と肥満に関する研究が盛んに行われるようになった一方で［1〜3］、免疫系が飢餓時の代謝制御に及ぼす影響についてはほとんど明らかになっていない。そのため、飢餓時に誘導される免疫系ー代謝系のクロストークの実態、そしてその詳細を明らかにすることが出来れば、代謝系の新たな制御基盤の構築が期待できる。

野生型マウスを24時間絶食させると肝臓が真っ白に変色する（図1a）。これは飢餓性脂肪肝と呼ばれ、ヒトでも飢餓時にしばしば観察される生理現象である。通常多くの生物は糖質を主なエネルギー源として利用しているが、絶食によって糖質が枯渇すると肝臓は脂肪酸を基質に「ケトン体」を合成し、糖質に代わるエネルギー源として末梢組織に分配する。そのため、絶食時には肝臓に多量の脂肪酸を供給する必要があり、飢餓性脂肪肝の誘導はその過程・結果を反映している。先天的に特定の免疫細胞を欠損した複数の遺伝子改変マウスをスクリーニングした結果、自然リンパ球（Innate lymphoid cell：ILC）と呼ばれる免疫細胞の一群を欠損したマウスは飢餓性脂肪肝の程度、そしてケトン体の合成量が野生型マウスに比べて有意に低いことが明らかとなった（図1a、b）。このことはILCが飢餓時の代謝制御、特にケトン体の合成制御に密接に関わる可能性を強く示唆したため、本研究はその詳細なメカニズムの解明を目指した。

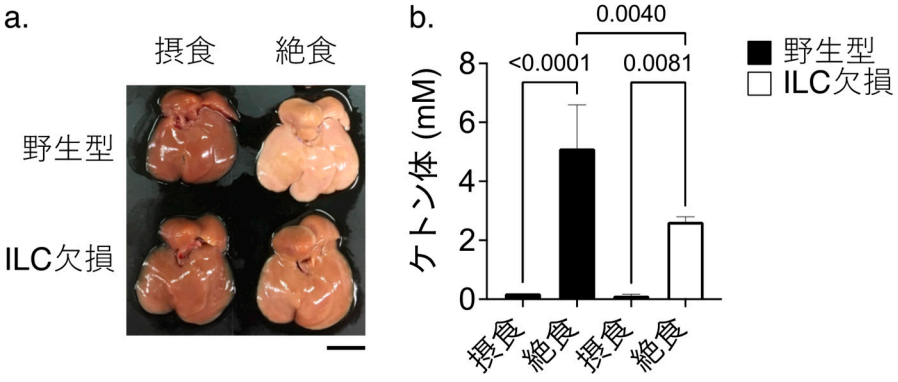


図 1. 飢餓性脂肪肝の誘導およびケトン体合成制御に対する免疫系の関与

a）野生型マウスと ILC 欠損マウス（Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウス）の肝臓を絶食前後で比較（スケールバー：1 cm）。

b）野生型マウスと ILC 欠損マウスの血中ケトン体濃度を絶食前後で測定。統計処理は one way ANOVA tukey test を実施。

方法および結果

1. ケトン体の合成制御に関わる ILC サブセットを同定する

ILC は近年新たに発見された組織常在型のリンパ球であり、その機能や遺伝子発現の違いから ILC1、ILC2、ILC3 の 3 つのサブセットに分類される。ILC は T 細胞や B 細胞などのリンパ球とは異なり抗原受容体を発現しておらず、代わりにサイトカイン、脂質、ホルモン、あるいは神経ペプチドなど多様な液性因子に対する受容体を高発現し、体内の環境変化に即座に反応して活性化する。また ILC は脂肪組織の恒常性維持を含む代謝系の制御とも密接に関わることが知られている［4］。それぞれの ILC サブセットを単独で欠損した遺伝子改変マウスを解析した結果、ケトン体の合成制御には ILC3 が関与することが明らかとなった（図 2a～c）。それと一致するように、絶食下におけるマウスの活動量は ILC3 の欠損によって大幅に低下していた（図 2d）。

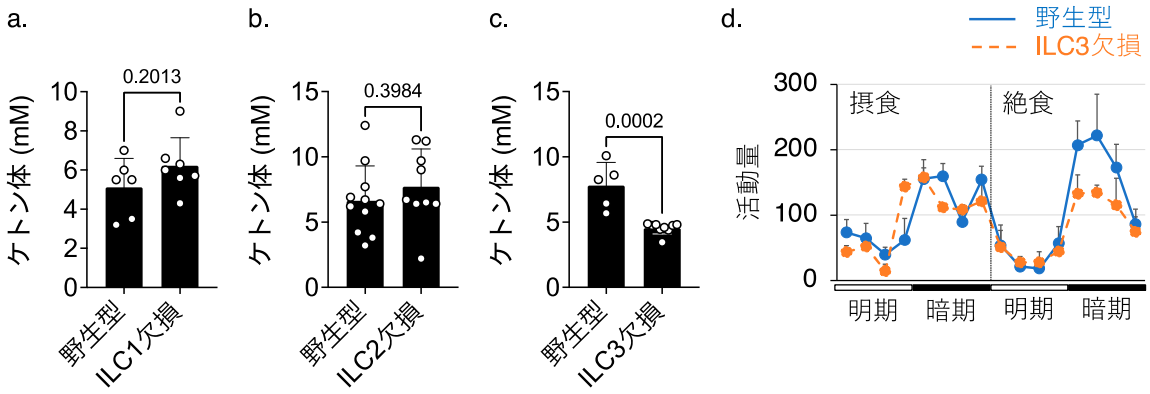


図 2. ケトン体の合成制御に関与する ILC サブセットの同定

a) ILC1 欠損マウス（IL-15$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウス）の血中ケトン体濃度を絶食前後で測定。

b) ILC2 欠損マウス（ROR$\alpha^{fl/fl}$Vav1-iCre$^{TG/+}$）の血中ケトン体濃度を絶食前後で測定。

c) ILC3 欠損マウス（RORgt$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウス）の血中ケトン体濃度を絶食前後で測定。

d) ILC3 欠損マウスの活動量絶食前後で測定。

統計処理は t-test を実施。

2. ケトン体の合成制御において ILC3 が担う役割を明らかにする

ILC3 は小腸常在型の ILC であり、Interleukin（IL）-17 や IL-22 の産生を介して腸管の恒常性維持に寄与する。では、肝臓という遠隔の臓器で行われるケトン体合成に対して ILC3 はどのような影響を及ぼすのだろうか？これまでケトン体の合成は脂肪分解の程度に強く依存すると考えられてきたが、その過程に ILC3 の関与は見出せなかった。脂肪酸を含む栄養素の一部は門脈を通じて小腸から肝臓に直接輸送される。興味深いことに、絶食させた野生型マウスの門脈血中では脂肪酸の濃度が有意に上昇していたが、ILC3 欠損マウスではほとんど変化がみられなかった（図 3a）。このことから、ILC3 は門脈依存的な脂肪酸輸送に作用することで、その後のケトン体合成を促進する可能性が示唆された。

野生型マウスの門脈血を絶食前後で回収しリピドミクス解析を行った結果、絶食後の門脈血中からパルミチン酸、オレイン酸、そしてリノール酸といった長鎖脂肪酸が高濃度で検出された。蛍光ラベルした長鎖脂肪酸を用いてその体内動態を解析した結果、飢餓時に門脈血中で検出される長鎖脂肪酸は小腸で吸収された脂質に由来することが判明した。通常、小腸で吸収された長鎖脂肪酸はカイロミクロンと呼ばれる大きなリポタンパク粒子に格納された後、リンパ管経由で末梢に運ばれる。リンパ管がカイロミクロンを取り込むことができるのはリンパ管内皮の接合が緩んでいるためであり、反対に血管内皮の接合は強く保たれているためカイロミクロンが血管に取り込まれることはない。したがって、本来であれば長鎖脂肪酸は門脈を通過することができない。野生型マウスの小腸から細胞を調製し、

single cell RNA-sequence（scRNA-seq）解析を行った結果、ILC3 は血管透過性促進因子の一つである VEGF-A を高発現することが明らかとなった（図 3b、c）。一方 ILC3 において VEGF-A の発現を欠損した遺伝子改変マウス（VEGFa$^{fl/fl}$CD127-Cre$^{TG/+}$マウス）では、門脈を介して輸送される長鎖脂肪酸の量やケトン体の合成量が有意に減弱していた（図 3d）。つまり、絶食によって活性化した ILC3 は小腸の血管構造を劇的に変化させ、小腸で吸収した脂肪酸が門脈を経て肝臓に到達しやすい状況を生み出すことでケトン体の合成を促進すると考えられる。

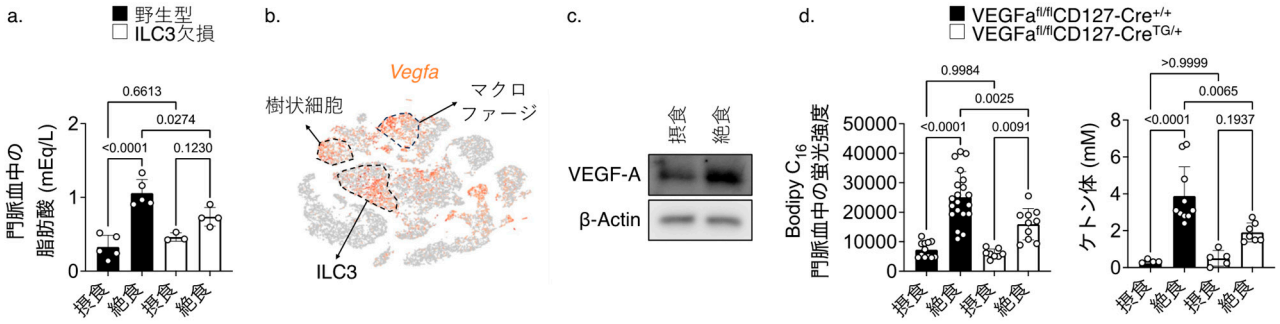


図 3. ケトン体の合成制御における ILC3 の作用点

a） ILC3 欠損マウスにおける門脈血中の脂肪酸濃度を絶食前後で測定。

b） scRNA-seq 解析を通じて、小腸における VEGF-A 産生細胞を網羅的に探索。

c） 野生型マウス小腸から絶食前後で ILC3 を単離し、VEGF-A の発現レベルをウェスタンブロット法で解析。

d） 蛍光ラベルされた長鎖脂肪酸（BODIPY C_{16}）を VEGFa$^{fl/fl}$CD127-Cre$^{TG/+}$マウスに経口投与し、その門脈血中における蛍光強度を絶食前後で測定（左）。
VEGFa$^{fl/fl}$CD127-Cre$^{TG/+}$マウスの血中ケトン体濃度を絶食前後で測定（右）。

統計処理は one way ANOVA tukey test を実施。

考　察

飢餓時のエネルギー代謝制御における免疫系の関与に着目し研究を行った結果、小腸常在型の免疫細胞である ILC3 がケトン体の合成制御に深く関与する可能性を見出した。ILC3 の本来の役割は小腸の恒常性維持であるため、本研究により得られた知見は ILC3 の知られざる機能を浮かび上がらせており、代謝学的観点だけでなく、免疫学観点においても新規性が高い。本助成期間中は ILC3 の下流で生じるイベントに焦点を当て解析を進めたが、今後は飢餓に応じて ILC3 が活性化するまでの過程を明らかにする予定である。ILC3 は腸管神経叢近傍に局在しており、その活性は多様な神経ペプチドや消化管ホルモンによって制御されている［5］。このことを踏まえ、例えば低血糖を起点に生じた中枢ー末梢神経系の連携やそこに由来するシグナルが ILC3 を活性化するという可能性について検討を進める予定である。

「絶食時は門脈の中を長鎖脂肪酸が通過する」という解析結果も本研究における重要な発見の一つである。先にも述べたように、長鎖脂肪酸はその大きさ故に門脈を通過できないと長らく考えられてきた。したがって、研究代表者の主張により説得力を持たせるためには、絶食時における長鎖脂肪酸の体内動態を視覚的に捉える試みが極めて重要だと考えている。この部分に関して、現在、血管学の専門家である慶應義塾大学の久保田義顕教授と共に解析に必要な技術基盤の構築・準備を進めている。

ケトン体はグルコースの代替エネルギーとして機能するだけでなく、感染防御応答や抗腫瘍免疫応答の活性化、そして高次脳機能の向上など人体にとって有益な生理機能を数多く発揮する。そのため本研究により得られる知見は、代謝系のみならず幅広い分野への応用が期待できる。昨年、新型コロナウィルス感染患者を対象としたコホート研究の結果、ケトン体の合成能が低い人は免疫系が正常に機能せず、症状が重篤化しやすい傾向にあることが報告された［6］。この事実は、他の生体応答と同様にケトン体の合成能にも個人差が存在することを強く示唆したが、それが何によって規定

されているかは十分に明らかになっていない。本研究を通じて「免疫系」がケトン体合成能を規定する要因の一つになり得ることが示されたため、遺伝子情報や腸内細菌情報などすでに個人差予測に利用可能な要素に加えて、将来的にはILC3 の状態を指標とした新たな疾患予測技術あるいは疾患予防策の創出にも繋げていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部解剖学教室の久保田義顕教授および田井育江講師、そして理化学研究所メタボローム研究チームの有田誠チームリーダーおよび磯部洋輔副チームリーダーである。

文　献

1) Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2013 May;14(5):454-60. doi: 10.1038/ni.2550. Epub 2013 Mar 17. PMID: 23502856

2) Misawa T, Saitoh T, Kozaki T, Park S, Takahama M, Akira S. Resveratrol inhibits the acetylated α-tubulin-mediated assembly of the NLRP3-inflammasome. *Int Immunol.* 2015 Sep;27(9):425-34. doi: 10.1093/intimm/dxv018. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25855661

3) Misawa T, SoRelle J, Choi JH, Yue T, Wang KW, McAlpine W, Wang J, Liu A, Tabeta K, Turer E, Evers B, Nair-Gill E, Poddar S, Su L, Ou F, Yu L, Russell J, Ludwig S, Zhan X, Hildebrand S, Li X, Tang M, Murray AR, Moresco EM, Beutler B. Mutual inhibition between Prkd2 and Bcl6 controls T follicular helper cell differentiation. *Sci Immunol.* 2020 Jan 24;5(43):eaaz0085. doi: 10.1126/sciimmunol.aaz0085. PMID: 31980486

4) Sasaki T, Moro K, Kubota T, Kubota N, Kato T, Ohno H, Nakae S, Saito H, Koyasu S. Innate Lymphoid Cells in the Induction of Obesity. *Cell Rep.* 2019 Jul 2;28(1):202-217.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.016. PMID: 31269440

5) Talbot J, Hahn P, Kroehling L, Nguyen H, Li D, Littman DR. Feeding-dependent VIP neuron-ILC3 circuit regulates the intestinal barrier. *Nature*. 2020 Mar;579(7800):575-580. doi: 10.1038/s41586-020-2039-9. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32050257

6) Karagiannis F, Peukert K, Surace L, Michla M, Nikolka F, Fox M, Weiss P, Feuerborn C, Maier P, Schulz S, Al B, Seeliger B, Welte T, David S, Grondman I, de Nooijer AH, Pickkers P, Kleiner JL, Berger MM, Brenner T, Putensen C; Bonn COVIMMUNE Consortium; Kato H, Garbi N, Netea MG, Hiller K, Placek K, Bode C, Wilhelm C. Impaired ketogenesis ties metabolism to T cell dysfunction in COVID-19. *Nature.* 2022 Sep;609(7928):801-807. doi: 10.1038/s41586-022-05128-8. Epub 2022 Jul 28. PMID: 35901960