

平成30年5月8日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07079

研究課題名(和文) 肥満におけるマクロファージスカベンジャー受容体 CD163の機能解明

研究課題名(英文) The relationship between CD163 macrophages and lipid metabolism

研究代表者

西東 洋一 (Saito, Yoichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・研究員

研究者番号：20783567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージに発現するHbスカベンジャー受容体であるCD163を欠損するCD163KOマウスは、高脂肪食による肥満に抵抗性を示し、WTマウスと比べ体重・肝重量・内臓脂肪量が有意に少なく、腸内細菌叢に変化が生じていた。

肥満化WTマウスの肝や精巣上体ではCD163陽性細胞が著減しており、組織炎症によってCD163を全く発現しない単球由来マクロファージが浸潤していることが分かった。

以上から、CD163が初期の肥満形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、新たな系統・個体発生学的解析のテーマとしてCD163は組織在住マクロファージのマーカーである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD163, Hb scavenger receptor, is expressed on macrophages. CD163 KO mice fed high fat diet showed resistance to obesity and had significantly lower body weight, liver weight, and visceral fat amount than WT mice, significantly. Intestinal bacterial flora of WT mice had also changed.

In the liver and epididymis of obese WT mice, CD163 positive cells were significantly reduced due to CD163 negative monocyte - derived macrophages infiltrating with tissue inflammation. Interestingly, monocyte-derived macrophages have never been able to express CD163.

These results suggested that CD163 plays an important role in early phase of obesity. In addition, it was suggested that CD163 may be a marker of tissue-resident macrophages.

研究分野：基礎病理学

キーワード：マクロファージ CD163 肥満 脂質代謝 慢性炎症 組織在住マクロファージ 単球由来マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ(Mφ)の活性化機構には、古典的活性化経路とオルタナティブ活性化経路が存在することが判明しており、Th1タイプのサイトカイン刺激により炎症惹起性に機能する古典活性化 Mφ (M1)に加えて、Th2タイプのサイトカイン刺激により抗炎症性+組織修復性に機能するオルタナティブ活性化 Mφ (M2)の2種類に大別されている。肥満に代表されるメタボリックシンドロームでは炎症惹起性のM1 Mφが脂肪組織に浸潤し、持続的な炎症状態(慢性炎症)を惹起することで、病態の持続・進展に關与する。

CD163はマクロファージに発現するヘモグロビンスカベンジャー受容体であり、M2 Mφのマーカーとして注目されているが、CD163が肥満・生活習慣病の病態形成にどのような役割(機能)を果たすのかについては未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、CD163の脂質代謝に対する詳細な機能を *in vivo* 及び *in vitro* で明らかにすることで、CD163に着目したマクロファージ活性化制御に基づく肥満・生活習慣病の病態解明とその制御による新規治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

- 1) CD163 KO 及び WT マウスに高脂肪食を投与して肥満・II型糖尿病モデルを作成し、肥満の程度や脂質異常、耐糖能異常などのメタボリックシンドローム病態の表現型の差異を検討した。
- 2) CD163 WT/KO マウスの通常食状態での基礎代謝の差異を検討するため、代謝ケージによる解析を行った。
- 3) 高脂肪食投与後の肝臓、精巣上体脂肪組織(内臓脂肪)に対し、CD163を含むMφ活性化マーカーの解析と、各臓器及び全身の炎症や脂質代謝関連分子の評価を行った。また、内臓脂肪蓄積量の評価のため、CT撮影を行った。
- 4) CD163 KO 及び WT マウスの Mφ と脂肪細胞との *in vitro* 共培養実験を行い、炎症や脂質代謝に対するCD163の機能を詳細に解析した。
- 5) CD163 WT/KO マウスに通常食/高脂肪食をそれぞれ投与した4群の糞を採取し、次世代シーケンスによる腸内細菌叢解析を行った。

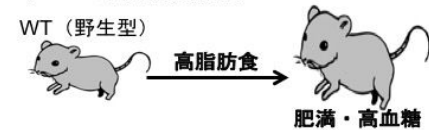
4. 研究成果

- (1) CD163 KO マウスは高脂肪食投与において肥満・耐糖能異常に対する抵抗性を示した:WT マウス群では1月程度で体重増

が認められたが、KO群では体重増加が鈍く、WT群に比べ有意に体重が低い結果を得られた。また、OGTT試験においても、通常食投与に比べ、高脂肪食投与のKO群に有意な血糖値の上昇は認められなかった。

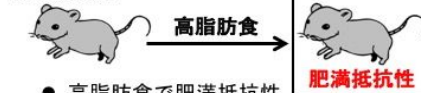
- (2) 通常食投与中のWT/KOマウス群間には有意な基礎代謝の違いが見られなかった:続いて、上記(1)の結果が両群の基礎代謝の差によって起こっている可能性を確認するために、代謝ケージによる基礎代謝のモニタリングを行った。まず、食事摂取量、飲水量、基礎体温に群間差は認めなかった。また、基礎代謝の指標である酸素摂取量、二酸化炭素排泄量、呼吸商、運動量についても群間差は認められなかった。以上より、高脂肪食投与によるKO群の肥満抑制効果は、CD163の有無による基礎代謝の変化によるものではないことが判明した。
- (3) 高脂肪食投与のKOマウス群では脂肪肝や精巣上体脂肪組織、内臓脂肪組織量の増加が抑制されていた:脂質代謝関連臓器での変化を捉えるため、肝臓と精巣上体脂肪組織(内臓脂肪の指標)について解析を行った。いずれの臓器でも、高脂肪食投与のKOマウス群ではWTマウス群と比べ有意な重量減が見られた。また、CTを用いた総内臓脂肪量を解析でも同様の結果であった。なお、WTマウス群では高度の脂肪肝が認められたが、KOマウス群では脂肪沈着はごく軽度に留まった。肝臓組織サンプルはqPCRを用いて炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6)や脂質関連因子(SREBP1, PPAR α , FASN, Foxo1, PPAR γ , Scd1, Irs1)の発現解析を行ったが、個体間差が大きく、一定の傾向を示さないデータであった。

<In vivo 高脂肪食投与>



- 高脂肪食で肥満・血糖値上昇
- 脂肪肝: CD163陽性細胞減少
- 精巣上体重量増: CD163陽性細胞減少

CD163 KO



- 高脂肪食で肥満抵抗性
- 血糖値の上昇を認めず
- 基礎代謝に有意差なし
- 脂肪肝抑制、精巣上体重量増抑制
- 腸内細菌叢で乳酸菌割合が増加



肥満形成においてCD163陽性マクロファージは腸内細菌叢を介した脂肪吸収に關与か?

図1: マウス高脂肪食投与試験

(4) 高血糖負荷・脂肪酸負荷による CD163 WT/KO マウスの腹腔 M 発現の差異：生活習慣病の病態形成に深く関与する慢性炎症のトリガーとして高血糖状態や血中遊離飽和脂肪酸が知られている。これらが M に与える影響を評価するため、CD163 WT/KO マウス両群から採取した腹腔 M に対して、高血糖付加、飽和脂肪酸付加を行い、その後の炎症性サイトカイン分泌を qPCR と ELISA で解析した。いずれの群も高血糖付加によって炎症性サイトカイン分泌が増加していたが、WT/KO 群間の差は見られなかった。また、飽和脂肪酸付加においては、炎症性サイトカインの上昇は全く見られなかった。飽和脂肪酸は培地に難溶性であり、溶け残りが発生すると炎症性サイトカイン分泌が認められた。これは不溶脂肪酸に対する異物反応と考えられ、脂肪酸の慢性炎症惹起性には疑問が残った。

(5) 脂肪細胞 (3T3-L1) と CD163 WT/KO マウス腹腔 M との共培養：次に、脂肪細胞と CD163 WT/KO 腹腔 M との細胞間相互作用に着目するため、共培養下でのサイトカイン (アディポネクチン, CCL-2, IL-6, TNF-) 分泌を ELISA で継続的に解析した。しかし、WT/KO 群間で有意な発現の差は認めなかった。

<In vitro 腹腔マクロファージ・脂肪細胞共培養実験>

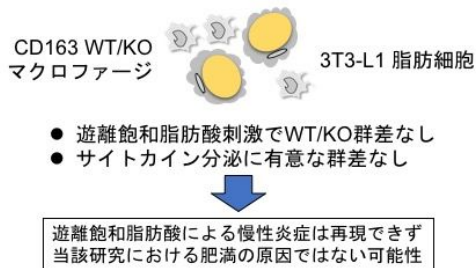


図2：マウス腹腔マクロファージによる実験

(6) CD163 KO マウス群では、高脂肪食投与においても、腸内細菌叢門が変化しなかった：上述の結果(3)~(5)より、脂肪細胞と M の相互作用による慢性炎症の程度差は CD163 WT/KO マウス群間に存在していないと判断し、脂肪の消化・吸収に差がないかを検討するため、両群の 24 時間の糞を全量回収し、腸内細菌叢の変化を解析することにした。まず、スクリーニング目的で細菌叢中の Firmicutes 属と Bacteroidetes 属の比率 (F/B ratio) を qPCR を用いて解析したところ、高脂肪食により肥満を呈した WT 群は F/B ratio の上昇が見られたが、KO 群では変化が認められなかった。この結果を踏まえて、通常食投与時から両群間に細菌叢の差がある可能性を考え、次世代シーケンズを用いた網羅的解析を行った。結果、Lactobacillus をはじめ、数種の腸

内細菌の増減が確認され高脂肪食投与の KO 群においても変化が保存されていた。

以上が本研究計画書に即して行った研究結果である。即ち、マウスにおいて CD163 を欠損させると、高脂肪食投与下でも体重増加が抑制され、血糖値の上昇も抑えられていることが分かった。その機序として、当初想定していた、高血糖や血中遊離飽和脂肪酸による慢性炎症の差は認められず、脂肪細胞と M の細胞間相互作用にも CD163 の有無が関与していなかった。一方で、高脂肪食投与の WT/KO マウス群間では腸内細菌叢の変化が認められた。以上から、CD163 は慢性炎症を基盤とした脂肪代謝系の変化には影響を与えていないことが分かった。

脂質代謝をメタボリックシンドロームの悪循環へ導く因子としては、血中遊離飽和脂肪酸が惹起する慢性炎症が、高血糖と共に注目されている。本解析でも、飽和脂肪酸を用いた M の刺激試験を行ったが、CD163 の有無に関わらず M の炎症性サイトカイン分泌を認めなかった。この解析の際、溶解量を上回る脂肪酸を用いて、培地中の不溶脂肪酸を許容して実験を行うと、M の炎症性サイトカイン分泌が誘導された。また、そもそも、飽和脂肪酸は難溶性であり、培地中にほとんど溶解しない。従って、飽和脂肪酸による M の炎症惹起性については不溶脂肪酸による異物反応を単純に捉えている可能性が高く、再考の必要があることを強調したい。

CD163 を発現する M は炎症抑制・組織修復・腫瘍増殖促進的に働くことが知られており、M の活性化マーカーとして利用されている。また、CD163 を欠損させると、M の炎症性形質が促進されることが知られている。

CD163 は腸内細菌叢の変化を基盤とした脂質の消化・吸収に寄与することで、脂肪蓄積や肥満の形成に関与している可能性が示唆された。特に Lactobacillus の変化が目立っており、腸管壁に在在する M の CD163 が、腸内細菌叢とどのような相互作用を有しているのか、追加解析を行っていく展望がひらけた。

<研究計画時に予定していなかった結果>

結果(3)の解析から派生する新たな研究テーマをもたらす結果を得たので以下に報告する。

高脂肪食を投与した CD163 WT マウス群の脂肪肝、肥大精巢上体中では免疫染色による解析で、通常食投与と比較して総 M 数 (F4/80 陽性細胞) が増加しているにも関わらず、CD163 陽性細胞数が著減していることが分かった。即ち、肥満化の過程で当該臓器の CD163 が WT マウスであっても KO に近い状況になっていることになり、CD163 は高脂肪食投与開始の初期段階で肥満の形成に大きく関わっていると推察される。

一方で、本研究外の参画研究において、CD163 KO マウスに複数の肉腫細胞株を皮下移植すると、WT マウスに比べ KO マウスで有意な腫瘍増殖抑制効果を示し、マウスにおいても、ヒトと同様に CD163 陽性 M が腫瘍増殖促進的に働くことを初めて示した。興味深いことに、肉腫を含む多くの腫瘍細胞株で皮下移植腫瘍を組織学的に解析すると、CD163 陽性 M は腫瘍の辺縁部に局在するのみで、腫瘍中心部の M (腫瘍随伴 M : TAM) にはほぼ陰性であった。これはヒトでは見られない現象である。

一般的に TAM は単球由来 M とされ、皮下を含むあらゆる臓器に定常的に在在している(組織在在)M は卵黄嚢由来 M とされている。そこで、組織在在 M が一定量含まれる腹腔 M と、骨髄から分離培養した骨髄・単球由来 M について CD163 の発現を確認したところ、CD163 は腹腔 M の一部にのみ発現していることが分かった。

これらの結果を総じて、「マウスにおいて、CD163 は卵黄嚢由来 M のマーカーである」という仮説を立てた。卵黄嚢由来 M は単球由来 M には無い個体発生や臓器再生能を有する特殊な M として、その存在と特異的機能が認識されつつあるものの、特異的マーカーが無いため、生体中のどの M がこれに由来するのか未だに議論が続いている。しかし、CD163 が卵黄嚢由来 M のマーカーになることを証明すれば、多くの研究機関が CD163 で M の起源を簡便に知ることができ、ひいては未解明の卵黄嚢由来 M の特異的機能の解明が飛躍的に進む可能性がある。

これまでの解析結果は、肥満の形成においても、腫瘍の進展においても卵黄嚢由来の可能性のある CD163 陽性 M が重要な役割を担っていることを示しており、どちらも、卵黄嚢由来 M の特異的機能を見ている可能性が高いと思われる。この議論に決着をつけるためにも、CD163 の発現に着目した M の起源解析を新たな研究テーマとして設定し、更に CD163 陽性 M を導入した組織再生へ応用することを目的とした研究計画を策定し、解析を開始している(平成 30 年度特別研究員-PD 採用;再生利用への応用を目指した CD163 陽性マクロファージの組織修復機能の解明:申請者 西東洋一)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

(全て査読あり)

1. Fujiwara Y, Saito Y, Shiota T, Cheng P, Ikeda T, Ohnishi K, Takeya M, Komohara Y. "Natural compounds that regulate lymph node sinus macrophages: Inducing an anti-tumor effect by regulating macrophage

activation." *Journal of clinical and experimental hematopathology*, 2018; 58: 17-23 DOI: 10.3960/jslrt.17032

2. Kitano Y, Okabe H, Yamashita YI, Nakagawa S, Saito Y, Umezaki N, Tsukamoto M, Yamao T, Yamamura K, Arima K, Kaida T, Miyata T, Mima K, Imai K, Hashimoto D, Komohara Y, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. "Tumour-infiltrating inflammatory and immune cells in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma." *British Journal of Cancer*, 2018; 118: 171-180 DOI: 10.1038/bjc.2017.401
3. Iriki T, Ohnishi K, Fujiwara Y, Horlaid H, Saito Y, Pan C, Ikeda K, Mori T, Suzuki M, Ichiyasu H, Kohroggi H, Takeya M, Komohara Y. "The cell-cell interaction between tumor-associated macrophages and small cell lung cancer cells is involved in tumor progression via STAT3 activation." *Lung Cancer*, 2017; 106: 22-32 DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.01.003

[学会発表](計 4 件)

1. 西東洋一、藤原章雄、菰原義弘、竹屋元裕. マウスにおける CD163 を使ったマクロファージ起源解析の可能性. 第 106 回日本病理学会総会 平成 29 年 4 月 27-29 日 京王プラザホテル (東京)
2. 西東洋一、藤原章雄、菰原義弘、竹屋元裕. マウス単球由来マクロファージと組織在在マクロファージにおける CD163 発現の違い. 第 62 回日本病理学会総会 平成 28 年 11 月 10 日-11 日 金沢市文化ホール (金沢)
3. 藤原章雄、西東洋一、菰原義弘、竹屋元裕. ヘモグロビンスカベンジャー (CD163) と脂質代謝との関連性について. 第 89 回日本生化学会大会 平成 28 年 9 月 25-27 日 仙台国際センター (仙台)
4. 西東洋一、藤原章雄、菰原義弘、竹屋元裕. CD163 陽性マクロファージと脂質代謝との関連性: CD163 欠損マウスは高脂肪食投与下で肥満抵抗性を示す. 第 105 回 日本病理学会総会 平成 28 年 5 月 12 日-14 日 仙台国際センター (仙台)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西東 洋一 (SAITO, Yoichi)
熊本大学・大学院生命科学研究部 (医)・研究員
研究者番号：20783567

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

藤原 章雄 (FIJIWARA, Yukio)