

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03543

研究課題名(和文) 脂肪血管のアポトーシスを起点とする生体反応の機序と制御

研究課題名(英文) Control of biological reaction mechanism originated from apoptosis of adipose tissue vasculature

研究代表者

梶本 和昭 (Kajimoto, Kazuaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10416216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が確立した脂肪血管標的型ナノDDSを用い、脂肪組織の血管内皮細胞に選択的にアポトーシスを誘導することで、脂肪組織に抗炎症性マクロファージが増加することを明らかとした。また、肥満に伴う脂肪組織に高発現するCYP1B1を標的として、その選択的阻害剤を搭載したナノDDSを用い、肥満に伴う脂肪組織の異常な血管新生を阻害できること、さらにマクロファージの浸潤も顕著に抑制できることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満の脂肪血管でCYP1B1が高発現していることを初めて見出し、さらにその選択的阻害剤を搭載したナノDDSを構築して、肥満に伴う脂肪組織の異常な血管新生とマクロファージの浸潤を有意に抑制することに成功した。脂肪組織に栄養と酸素を供給する血管の増加こそが脂肪組織に慢性的な炎症状態をもたらす病態の本質であることを示す重要な手がかりとなる。本研究で得られた知見を応用することで、肥満に伴う脂肪組織慢性炎症を根本的に解消する新たな治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was found that anti-inflammatory macrophages were increased in adipose tissue by inducing apoptosis of the vascular endothelial cells in the tissue via the adipose-vasculature targeted nano drug delivery system (DDS), which was established in the previous study by the principal investigator. Moreover, it was found the increased expression of Cyp1b1 mRNA in the obese adipose vasculature of mice through microarray analysis. Then, it was successfully described that not only angiogenesis but also infiltration of macrophages in obese adipose tissue was significantly inhibited by the administration of the CYP1B1 specific inhibitor via the nanoDDS.

研究分野：生体医工学

キーワード：脂肪組織 血管内皮細胞 アポトーシス DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満はインスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病や脂質異常症、動脈硬化などの発症要因となる。肥満からインスリン抵抗性が誘起される背景には脂肪組織の慢性炎症が関与しているが、脂肪組織に炎症が生じる原因や慢性化するメカニズムは解明されていない。

研究代表者はこれまでの研究で、新たな肥満治療薬としての応用を目指し、脂肪組織の血管を標的とする全身投与型ナノ DDS (ドラッグデリバリーシステム) の開発に世界で初めて成功した[1]。「脂肪組織に栄養と酸素を供給する血管を遮断して脂肪細胞を兵糧攻めにする」との視点から、アポトーシス誘導剤 [β -(KLAKLAK) $_2$] を内包した脂肪血管標的化ナノ DDS (以下、KLA-ナノ DDS) を構築し、疾患モデル動物に対する有意な肥満抑制効果を実証するとともに、KLA-ナノ DDS を投与した肥満モデルマウスでは脂肪組織炎症が鎮静化し、インスリン抵抗性が改善したこと示唆する想定外の現象を見出した。KLA-ナノ DDS には炎症抑制作用やインスリン抵抗性改善作用を有する薬効成分は一切含まれていないため、直接的な効果とは考えにくい。つまり、脂肪血管のアポトーシスが引き金となって何らかの生体反応が誘起された結果として顕在化した間接的な効果であると推測される。

近年の研究で、CD8 陽性 (細胞障害性) T 細胞や CD4 陽性 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1)、IgG 陽性 B 細胞といった抗原特異的な免疫応答 (獲得免疫) の中心的役割を果たす細胞群が肥満の進行とともに脂肪組織に浸潤して炎症を誘発し、インスリン抵抗性を増悪させる要因となることが明らかにされつつある。このような獲得免疫に関わる細胞群の集積は自己免疫疾患の特徴と類似していることから、肥満の脂肪組織では自己に対する異常な免疫応答が生じている可能性が考えられるが、詳細な機序は不明である。一方、アポトーシスは生理的な細胞死であり、生体内でアポトーシスを起こした細胞はマクロファージ等の食細胞により速やかに貪食される。食細胞によるアポトーシス死細胞の処理は不要な細胞を排除するだけでなく、死細胞に含まれる自己抗原を有効活用することで自己に対する不適切な免疫応答を抑制する「自己免疫寛容」を維持するのに重要な役割を果たしている。以上のことから、脂肪血管のアポトーシスを起点として特異的な免疫寛容が誘導された結果、肥満に伴う脂肪組織の異常な自己免疫応答が抑制されて炎症の鎮静化やインスリン抵抗性の改善につながった可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の開始当初の目的は、上記の背景およびこれまでの研究成果から導き出された「脂肪血管に対する特異的な免疫寛容の誘導によって脂肪組織の慢性炎症が鎮静化し、インスリン抵抗性が改善する」という独自の仮説を実証するとともに、肥満の脂肪組織における異常な自己免疫応答を正常化するための標的分子を同定することである。また、脂肪血管のアポトーシスを模倣することで特異的な免疫寛容を積極的に誘導する技術を確立し、疾患モデル動物における治療効果を検証し、新しい原理に基づく肥満および関連疾患の根治療法の確立へ展開することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 脂肪血管標的化ナノ DDS (CytC-ナノ DDS) による抗肥満効果の検証

二段階乳化による W/O/W エマルジョンの調製と溶媒留去を介してリポソームを調整する microencapsulation vesicle (MCV) 法を用い、アポトーシス誘導剤として Cytochrome c (CytC) を内包した CytC-ナノ DDS を調製した。

野生型の 8 週齢 C57BL/6J マウスを 2 グループに分け、高脂肪食負荷を開始するとともに、一方のグループは対照群、他方は CytC-ナノ DDS を 6mg CytC/kg の容量で 3 日毎に 5 回、尾静脈より投与し、その間の体重変化を追跡した。

(2) CytC-ナノ DDS 反復投与による肥満抑制モデルマウスの脂肪組織におけるマクロファージサブセットの解析

対照群あるいはナノ DDS 投与群の精巢上体脂肪組織を摘出し、間質-血管細胞画分を単離してマクロファージサブセットを CD11c および CD206 の発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。

(3) CytC-ナノ DDS 単回投与による肥満モデルマウスの脂肪組織におけるマクロファージサブセットの解析

上記と同様の条件で、高脂肪食誘導性肥満モデルマウスに CytC-ナノ DDS を投与し、その 1~3 日後に精巢上体脂肪組織の間質-血管細胞画分に含まれるマクロファージサブセットを CD11c および CD206 の発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。

(4) CYP1B1 選択的阻害剤を搭載したナノ DDS による脂肪組織血管新生およびマクロファージへの影響の解析

2,3',4,5'-tetramethoxystilbene (TMS) をナノ DDS に搭載し、高脂肪食誘導性肥満モデルマウスに

TMS-ナノ DDS を 30mg TMS/kg の容量で 3 日毎に 5 回、尾静脈より投与し、体重、脂肪組織重量や血糖値、摂食量を測定した。また、精巢上体脂肪組織を摘出し、その小片を蛍光標識レクチン (GSIB4) または蛍光標識 F4/80 抗体を用いて染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) アポトーシス誘導剤として Cytochrome c (CytC) を内包した CytC-ナノ DDS による抗肥満効果の検証

単純水合法や逆相蒸発法などのリポソーム調製法は、水溶性薬物の封入率が数%程度と低く、スケールアップが困難という問題があった。これに対し、研究代表者は、二段階乳化による W/O/W エマルジョンの調製と溶媒留去を介してリポソームを調整する microencapsulation vesicle (MCV) 法を応用し、CytC などの水溶性タンパク質を 50%程度の高い封入率でリポソームの大量調製が可能なる手法を確立している [2]。また、本法を用いて、脂肪血管に対する標的化リガンドを修飾したりリポソームの調整が可能であることも判明している。そこで、本検討では、MCV 法で調製した CytC-ナノ DDS を使用し、野生型マウスに高脂肪食負荷の開始とともに CytC-ナノ DDS を 6mg CytC/kg の容量で 3 日毎に 5 回、尾静脈より投与し、その間の体重の変化を追跡した。その結果、対照群の体重は 15 日間で 15%増加したのに対し、CytC-ナノ DDS 投与群の体重増加率は 7.8%と有意に抑制され、MCV 法で調製した CytC-ナノ DDS が、以前の研究で使用した KLA-ナノ DDS (逆相蒸発法で調製) と同等の抗肥満効果を示すことが確認できた (図 1)。

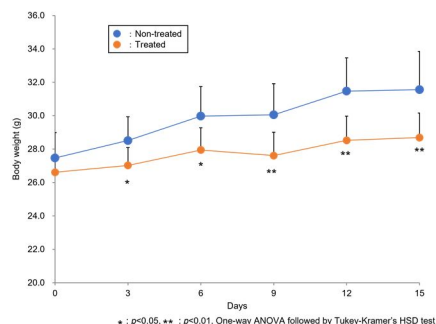


図 1. CytC-ナノ DDS による抗肥満効果

(2) CytC-ナノ DDS 反復投与による肥満抑制モデルマウスの脂肪組織におけるマクロファージサブセットの変化

上記 (1) と同様の条件で CytC-ナノ DDS を 10 回反復投与したマウスの精巢上体脂肪組織を摘出し、間質-血管細胞画分を単離してマクロファージサブセットを CD11c および CD206 の発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。その結果、対照群の脂肪組織では M2 マクロファージの割合が約 13% であったのに対し、CytC-ナノ DDS 投与群の脂肪組織では、20% 以上に増加しており、その差は統計的にも有意であることが明らかとなった (図 2)。

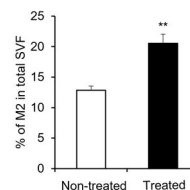
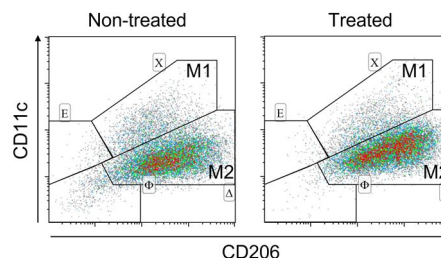


図 2. CytC-ナノ DDS 反復投与による脂肪組織マクロファージの変化

(3) CytC-ナノ DDS 単回投与による肥満モデルマウスの脂肪組織におけるマクロファージサブセットの変化

上記 (2) に加えて、高脂肪食誘導性肥満モデルマウスに CytC-ナノ DDS を投与し、その 1~3 日後に精巢上体脂肪組織の間質-血管細胞画分に含まれるマクロファージサブセットを CD11c および CD206 の発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。

その結果、M2 マクロファージの割合は、投与 1 日後には約 1% 増加し、3 日後には約 2.5% 増加することが明らかとなった。また、M0 マクロファージの割合は CytC-ナノ DDS 投与の 1 日後では未処置群と同程度でほとんど変化がなかったのに対し、投与 2 日後および 3 日後では未処置群のおよそ半分程度にまで減少していた (表 1)。これらの結果から、CytC-ナノ DDS の投与により脂肪血管内皮細胞のアポトーシスが誘導され、その結果として脂肪組織中に存在する M0 から M2 マクロファージへの活性化が亢進したと考えられる。一方、CytC-ナノ DDS の投与 1~3 日後においてマウスの体重や脂肪組織重量にはほとんど変化は認められなかったことから、脂肪組織中のマクロファージに対して誘導される変化は、肥満に対する治療効果よりも早い段階で引き起こされるこ

表 1. CytC-ナノ DDS 単回投与後の脂肪組織マクロファージサブセット

Macrophage subset	Non-treated (% in total SVF)	Treated with CytC-nanoDDS		
		day1	day2	day3
M0	2.04	2.35	1.21	0.92
M1	2.99	2.16	2.68	3.33
M2	10.65	11.60	12.47	13.26

とが強く示唆された。

(4) CYP1B1 選択的阻害剤を搭載したナノ DDS による脂肪組織血管新生およびマクロファージ集積の抑制

当初、ペプチドアレイを用いて異常な免疫応答を引き起こす自己抗原候補分子の探索を行う計画であったが、予定していたペプチドアレイが製造中止となり、コロナ禍で同等の性能を有する代替品の手配も困難であったため、マイクロアレイを用いて治療ターゲット因子の探索を行った。その結果、肥満モデルマウスの脂肪組織血管内皮細胞において *Cyp1b1* mRNA の発現が顕著に更新していることを見出した。以前の研究で、CYP1B1 は血管内皮機能の維持や血管新生に必須の役割を担うことが報告されている [3]。また、肥満の脂肪組織では血管新生が異常亢進し、これが引き金となってマクロファージ等の炎症性細胞の遊走、浸潤を促進することが示唆されている [4]。そこで、CYP1B1 選択的阻害剤である 2,3',4,5'-tetramethoxystilbene (TMS) をナノ DDS に搭載し、肥満モデルマウスに投与することによって脂肪組織にどのような変化が生じるかを調べた。高脂肪食誘導性肥満モデルマウスに TMS-ナノ DDS を 30mg TMS/kg の容量で 3 日毎に 5 回、尾静脈より投与し、その間の体重の変化を追跡した。その結果、

TMS-ナノ DDS の投与によって高脂肪食負荷条件においても体重が減少する傾向が見られたが、対照群と比較して有意な差ではなかった。また、脂肪組織重量や血糖値、摂食量にも顕著な差は認められなかった (図 3)。次に、TMS-ナノ DDS の反復投与による脂肪組織血管新生への影響を調べるため、蛍光標識レクチン (GSIB4) を用いて脂肪組織小片を蛍光染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。その結果、TMS-ナノ DDS 投与群の脂肪組織では、血管新生の場である Adipogenic-angiogenic cell cluster が有意に減少していることが明らかとなった (図 4)。さらに、蛍光標識 F4/80 抗体を用いて染色した結果、マクロファージの集積も有意に減少することが判明した (図 5)。以上のことから、CYP1B1 を標的として脂肪組織における異常な血管新生を阻害することで、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ等の炎症性細胞の浸潤を抑制できることが示された。今後、本研究で得られた知見を応用することで、肥満に伴う脂肪組織慢性炎症を根本的に解消する新たな治療法の開発につながることを期待される。

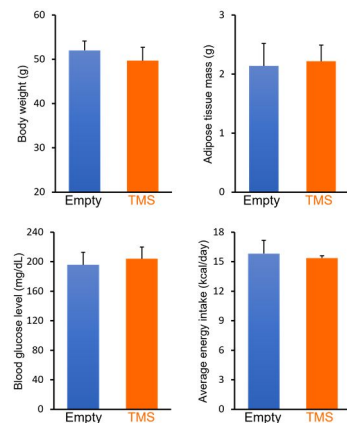


図 3. TMS-ナノ DDS 投与による抗肥満効果の検討

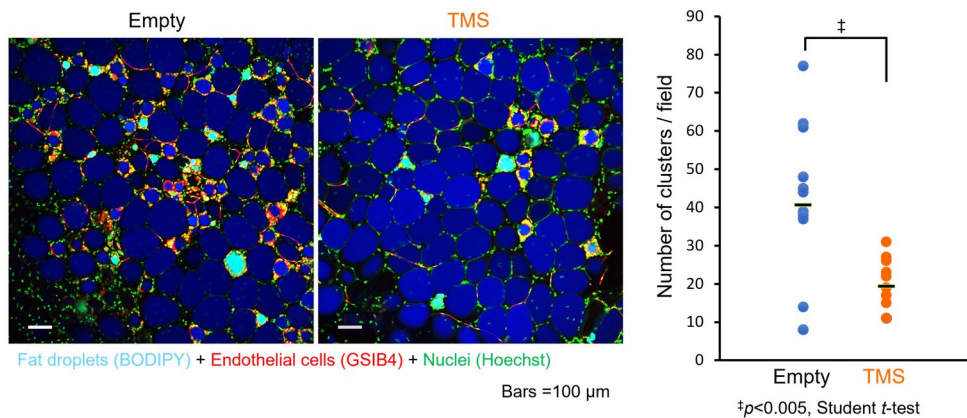


図 4. TMS-ナノ DDS 投与による脂肪組織血管新生の抑制

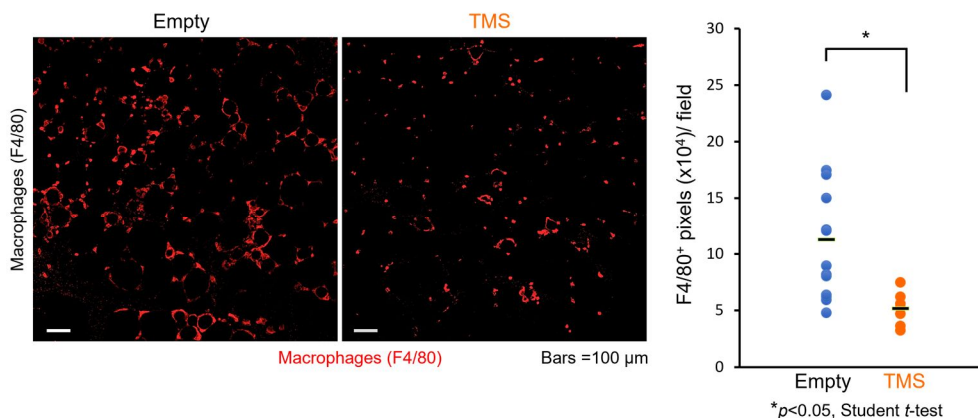


図 5. TMS-ナノ DDS 投与による脂肪組織マクロファージの減少

<引用文献>

- [1] Hossen MN. Kajimoto K. *et al.*, *J Control Release* **171**, 104-122 (2013)
- [2] Kajimoto K. Katsumi T. *et al.*, *J Am Oil Chem Soc* **95**, 101-109 (2018)
- [3] Falero-Perez J. Song YS. *et al.*, *PLoS One* **13**, e0206756 (2018)
- [4] Nishimura S. Manabe I. *et al.*, *Diabetes* **56**, 1517-1526 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------