

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16392

研究課題名（和文）免疫シグナル分子DAP12の代謝性組織リモデリングにおける意義の解明

研究課題名（英文）The role of the adapter protein DAP12 in obesity-induced "metabolic" tissue remodeling

研究代表者

吉岡 直輝（Yoshioka, Naoki）

名古屋大学・環境医学研究所・客員研究者

研究者番号：10943590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究で、過栄養により誘導される代謝臓器（脂肪組織、肝臓）における慢性炎症と組織リモデリングにおける免疫シグナル分子DAP12の意義を検討した。脂肪組織と肝臓における炎症慢性化の起点として既に報告している微小環境を構成するマクロファージにおいて、DAP12タンパクは特異的に高発現することが明らかになった。また、DAP12が慢性炎症に与える影響は脂肪組織と肝臓で異なることを新たな知見として得た。その分子メカニズムとして、DAP12はマクロファージの遊走能と死細胞貪食能に重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、「疾患特異的マクロファージ」の概念が提唱され、マクロファージは多種多様であり、疾患発症に決定的な役割を果たす少数の亜集団が存在する可能性が指摘されている。最近では、Single-cell RNA sequencing解析の結果から、肥満による脂肪組織や肝臓での病態進行に特異的に関わるマクロファージの亜集団として、TREM2陽性マクロファージが注目されている。DAP12を高発現するマクロファージは、脂肪組織と肝臓における炎症慢性化の起点となる微小環境に集積している点がユニークであり、本研究成果は、将来的に位置情報や細胞内代謝に基づくマクロファージサブタイプの提案につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the significance of the adapter protein DAP12 in chronic inflammation and tissue remodeling in metabolic organs (adipose tissue and liver) induced by obesity. We found that DAP12 protein is specifically highly expressed in macrophages, which constitute the microenvironment we have already reported as the starting point of chronic inflammation in adipose tissue and liver. In addition, we found that the effect of DAP12 on chronic inflammation differs between adipose tissue and liver. As a molecular mechanism, DAP12 was found to play an important role in the migratory ability and dead cell phagocytosis of macrophages.

研究分野：肝臓学

キーワード：慢性炎症 マクロファージ メタボリックシンドローム 肥満 脂肪肝 MASH

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの基盤病態として慢性炎症が注目されており、実際、脂肪組織や肝臓などの代謝性臓器では、肥満の過程で代謝ストレスを受けて細胞死に至った実質細胞(脂肪細胞や肝細胞)と間質細胞の相互作用により慢性炎症が惹起され、最終的には線維化をきたし臓器機能障害に至る(代謝性組織リモデリング)。慢性炎症の起点においてマクロファージが中心的役割を果たすが、組織内に存在するマクロファージは一様ではなく、多様なサブタイプが存在することが明らかになってきた。これは組織内の微小環境に応じて、マクロファージが機能変化するためと考えられている(Lackey et al. Nat Rev Endocrinol 2016; Kazankov et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2019)。しかしながら、慢性炎症の起点となる微小環境が形成される分子メカニズムについては、未だ不明の点が多い。

研究代表者のグループや他の研究グループは、肥満の脂肪組織と metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) の肝臓において共通した微小環境 (CLS: crown-like structure) が形成されることを報告してきた。CLS では、過剰に脂質を蓄積して細胞死に陥った脂肪細胞や肝細胞をマクロファージが取り囲んで貪食・処理している。さらに研究代表者のグループは、CLS は炎症遷延化や線維化の起点となることを明らかにし (JCI Insight 2017; Nat Commun 2014; PLoS ONE 2013) CLS を構成するマクロファージに注目して研究を続けてきた。

2. 研究の目的

研究代表者は、免疫シグナル分子 DAP12 (DNAX activating protein of 12 kDa) が脂肪組織と肝臓の両方において CLS 形成に関わることを予備的に見出した。そこで本研究では、CLS 形成における DAP12 の意義を明確化するとともに、マクロファージの遊走能や貪食・処理能における DAP12 の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 複数の飼料を用いて食餌性肥満モデルを作製し、脂肪組織や肝臓における遺伝子発現プロファイルや組織像を解析し、肝臓や脂肪組織における DAP12 遺伝子発現の経時的变化や DAP12 陽性細胞の局在について検討した。

(2) CLS 形成における DAP12 の関与を明確化するため、(全身) DAP12 欠損マウスと骨髄移植法による骨髄細胞特異的 DAP12 を欠損したマウスを用いて、食餌性肥満を誘導した。表現型や、各組織へのマクロファージ浸潤、CLS 形成と線維化について評価を行い、野生型マウスと比較した。

(3) Boyden chamber 法を用いて、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) に対する走化性を評価し、マクロファージの遊走能を検討した。

(4) 野生型マウスと DAP12 欠損マウスの骨髄細胞を蛍光色素 (PKH26 と PKH67) でそれぞれ標識した後に混合し、肥満マウスへ眼窩投与し、脂肪組織へ浸潤した細胞をフローサイトメトリーで解析し、PKH26 陽性細胞 (野生型マウス由来) と PKH67 陽性細胞 (DAP12 欠損マウス由来) の数を比較した。

4. 研究成果

野生型マウス、および DAP12 欠損マウスに高脂肪高コレステロール食 (GAN diet) を 20 週間負荷し、肝臓や脂肪組織の解析を行った。野生型マウスに GAN diet を負荷すると、肝臓や脂肪組織において DAP12 遺伝子発現が経時的に上昇し、DAP12 は主に免疫細胞に局在することを確認した。そこで、野生型マウスと DAP12 欠損マウスを比較したところ、体重や肝重量、脂肪組織 (副睾丸周囲脂肪組織) 重量には差を認めず、血中肝機能マーカー (AST、ALT) にも明らかな差はなかった (図 1)。

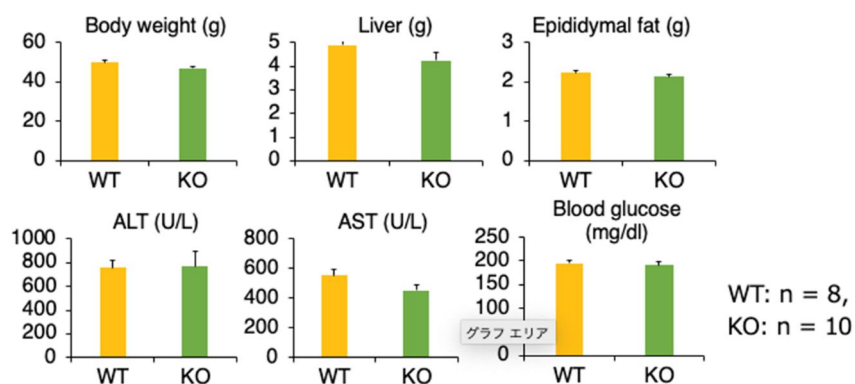


図1. DAP12欠損マウスに対するGAN diet負荷:
臓器重量と血液データ

しかしながら、脂肪組織を病理組織学的に解析すると、DAP12 欠損マウスで脂肪細胞径の増大（肥大化）、CLS 数の減少が認められ、これに合致して、炎症性サイトカインやマクロファージマーカー、線維化マーカーに関する遺伝子発現が著明に抑制された（図 2）。一方、肝臓では、CLS 数や肝線維化が軽減する傾向であったが変化は軽度であり、遺伝子発現レベルでは顕著な差を認めなかった（図 3）。

脂肪組織では、主に骨髓由来の浸潤マクロファージが CLS を形成する。そこで、DAP12 欠損がマクロファージの遊走能に及ぼす影響を検討した。Boyden chamber 法を用いてマクロファージの遊走能を検討したところ、DAP12 ノックダウンにより MCP-1 に対する走化性が著明に抑制されることを見出した。さらに、肥満を誘導した野生型マウスに対して、野生型および DAP12 欠損マウスの骨髓を移入する実験を行ったところ、脂肪組織に浸潤したマクロファージ数は DAP12 欠損で顕著に減少した。これらの結果より、DAP12 はマクロファージの遊走に重要な役割を果たすことが明らかになった。

一方、肝臓では、主に組織常在性マクロファージが CLS を形成するため、DAP12 欠損があまり影響を及ぼさない可能性がある。しかしながら、*in vitro* の死細胞貪食実験で、DAP12 欠損による抑制効果を見出した。CLS は死細胞の貪食・処理に時間がかかり、死細胞とマクロファージの相互作用が遷延する状態のため、DAP12 欠損による死細胞貪食能の低下が慢性炎症や線維化に影響を及ぼしている可能性がある。

DAP12 を高発現するマクロファージは、脂肪組織と肝臓における炎症慢性化の起点となる微小環境に集積している点がユニークであり、本研究結果は、将来的に位置情報や細胞内代謝に基づくマクロファージサブタイプの提案につながると期待される。

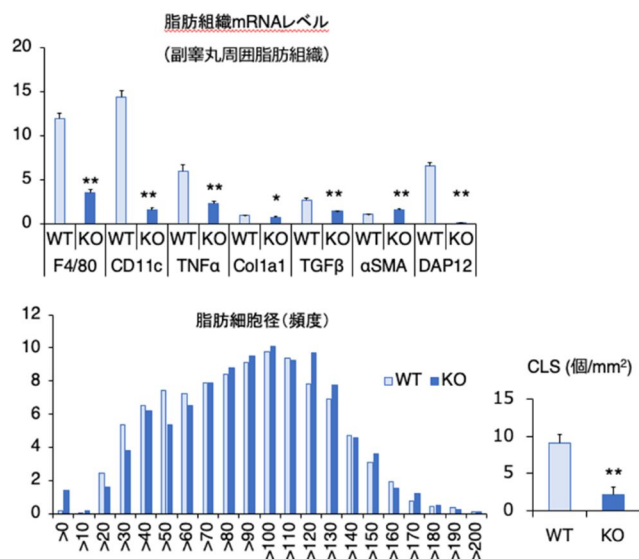


図2. DAP12欠損マウスに対するGAN diet負荷：脂肪組織mRNAと病理組織学的解析

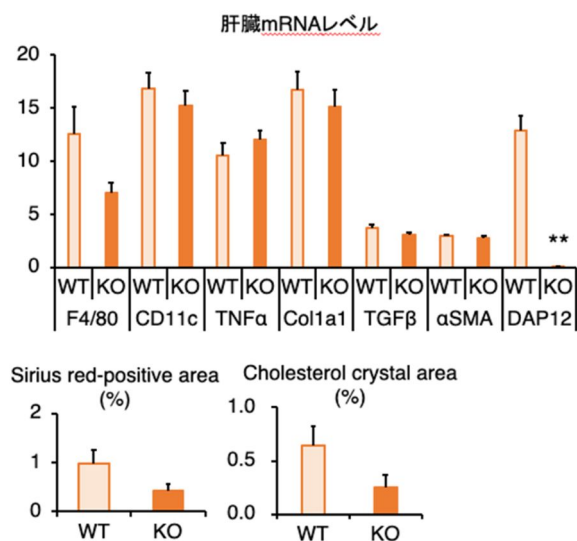


図3. DAP12欠損マウスに対するGAN diet負荷：肝臓mRNAと病理組織学的解析

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 田中都、越智梢、吉岡直輝、才田恵美、菅波孝祥
2．発表標題 免疫シグナル伝達分子が脂肪組織炎症に及ぼす影響
3．学会等名 第44回日本肥満学会
4．発表年 2023年

〔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
---------	---------