

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390196

研究課題名(和文) AIMの機能制御による炎症抑制によるメタボリックシンドロームの予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of prophylaxis and therapy system for metabolic syndrome by regulation of AIM function

研究代表者

新井 郷子 (Arai, Satoko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60422276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージが産生する分泌タンパク質AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) は、肥満やそれに伴うインスリン抵抗性惹起等の生活習慣病に深く関る分子であり、体内AIMの機能や量の制御は、AIMが関る疾患の予防や病態進行の制御に有効である可能性がある。本研究では、AIMの機能および量的制御方法の探索を行い、また肥満由来の自己抗体産生および脂肪肝由来肝がんについてAIMと疾患の関連性を明らかにした。さらにヒトにおいて健常者および肝疾患患者における血中AIM値測定を大規模に行うことで、AIMによる疾患の制御の可能性および疾患マーカーとしての有用性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Since AIM (apoptosis inhibitor of macrophage), a secreted protein produced from macrophages, has been shown to be involved in metabolic syndromes such as obesity, insulin resistance and atherosclerosis, regulation of both function and amount of AIM in body can be effective to prevent or control the AIM-related diseases. In this study, we investigated mechanism and materials for regulation of function and level of AIM. In addition, we presented that AIM is involved in the obesity-derived diseases such like auto-reactive antibody production and steatosis-derived hepatocellular carcinoma. Furthermore, we performed a large-scale analysis for blood AIM concentration in human including healthy individuals and patients with liver diseases, and demonstrated that AIM can be applied for the diagnosis of HCC in humans.

研究分野：疾患生命科学

キーワード：AIM 生活習慣病 HCC

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、肥満の進行を基礎としてインスリン抵抗性を惹起し、続いて2型糖尿病、動脈硬化症といった様々な制御困難な疾患群をドミノ倒しの様に発症する深刻な現代病である。近年、これらの疾患の病態進行には、内臓脂肪や疾患局所における慢性炎症の持続が非常に深く関与していることが明らかになった。我々は、これまでの研究によって、肥満が原因となる炎症の誘発や持続には、マクロファージが産生する分泌タンパク質 AIM が深く関与し、病態進行に非常に強く影響していることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、AIM がメタボリックシンドロームの病態進行にどのように関与するかを解析し、阻害剤の探索等を通してその機能を制御することにより、将来的にメタボリックシンドローム予防・治療に役立てることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) AIM の機能制御法の探索

(1-a) AIM の機能的阻害剤の探索

これまでの知見より、肥満脂肪組織において脂肪細胞が AIM を取り込むことで脂肪分解が誘導されることが脂肪組織における慢性炎症を誘発し、インスリン抵抗性の惹起につながる可能性が示唆された。そこで、AIM の機能抑制が可能な分子の探索を行った。低分子化合物の探索および中和抗体として AIM に対するモノクローナル抗体を作製した。

(1-b) AIM の体内量調節の解析

AIM の量的調節の制御に関する知見を得るため、AIM の体内での安定性を詳細に解析した。AIM は血中では免疫グロブリン M (IgM) 五量体に結合することで尿中への排泄から免れ、体内で安定に存在していることがわかっている。そこで、AIM-IgM 複合体について結合部位や半減期等の解析を行った。

(2) AIM と生活習慣病の病態進行との関連の解析

(2-a) 肥満由来の自己免疫疾患との関連性

肥満が進行することで様々な自己免疫疾患が誘導される素因となることが臨床的に報告されている。そこで AIM^{-/-}マウスと野生型(AIM^{+/+})マウスに高脂肪食を投与し、AIM の有無が肥満による自己抗体産生に関与するかどうか解析した。

(2-b) 脂肪肝由来肝がんとの関連性

生活習慣病のひとつとして注目される NAFLD (Nonalcoholic fatty liver disease; 非アルコール性脂肪性肝疾患) と AIM の関与を解析するために、AIM^{-/-}マウスと AIM^{+/+}マウスに高脂肪食を投与し、脂肪肝の形成お

よび脂肪肝由来肝がん誘導における AIM の関与を解析した。

(3) ヒト血中 AIM 濃度の計測 (大規模コホート)

健康診断受診健常者約 8000 人および肝がん患者を含む肝疾患患者約 400 人の AIM の血中濃度を測定し、血中 AIM 値と疾患との関連性をヒトにおいて解析した。

4. 研究成果

(1) AIM の機能制御法の探索

(1-a) AIM の機能的阻害剤の探索

AIM の機能阻害剤として以下の 2 つを行った。

低分子化合物の探索

AIM の機能を阻害する低分子化合物の候補が得られ、in vitro における検証を行った。

抗(マウス・ヒト)AIM モノクローナル抗体の作製

マウスおよびヒト rAIM (recombinant AIM) を作製し、ラットに免疫することにより、マウスおよびヒト AIM に対するモノクローナル抗体を作製した。作製された抗体について、それぞれ 50 種類以上についてその機能性の解析を行い、ウェスタンブロットティング、免疫沈降、免疫染色、抗体によるタンパク質のアフィニティ精製、ELISA による AIM 量計測に用いることが可能なモノクローナル抗体を数種類ずつ得ることが出来た。AIM の機能(脂肪分解能)を阻害する機能的抗体の探索も行ったが、そのような抗体を得ることはできなかったが、今後の研究・解析に有用な抗体を複数種得ることが出来た。

(1-b) AIM の体内量調節の解析

AIM は血中では IgM 五量体に結合することで尿中への排泄から免れ、体内で安定に存在する。そこで、ヒトにおいて AIM の体内量調節を可能とする一助とするために、ヒト AIM と IgM の結合について解析を行った。AIM は IgM においては、抗体を認識する可変領域ではなく、定常領域 (Fc) に結合することが明らかになった。IgM 五量体は 5 つの IgM が IgJ 鎖によってリンクされることにより、五量体を形成している。AIM の IgM への結合は IgJ 鎖が必要であることも明らかになった。また、AIM-IgM 複合体の血中における半減期は 12-16 時間であることが明らかになった。この発見は文献として PLoS ONE 誌に発表した。これらの解析により、IgM と AIM の結合を阻害することができれば体内 AIM 量を減少させ、逆に結合を促進すれば体内 AIM 量を増加させることが可能になることがわかり、今後の生活習慣病予

防・治療における AIM 量の制御に関する有用な知見が得られた。

(2) AIM と生活習慣病の病態進行との関連の解析

(2-a) 肥満由来の自己免疫疾患との関連性

AIM^{-/-}マウスと野生型 (AIM^{+/+}) マウスに高脂肪食を投与すると、野生型では 12 週間後には様々な自己抗原に対する抗体が産生されているが、AIM^{-/-}マウスではそのような自己抗体産生が行わないことが明らかになった。その理由として、常に体内を循環しているナチュラル IgM にも AIM が結合しているが、この AIM の結合が IgM の機能に影響を与えていることを明らかにした。すなわち、高脂肪食を与え、肥満が進行すると、血中の脂肪酸濃度が上昇することにより、B 細胞が非特異的に活性化され、非特異的に IgM 産生が誘導される。IgM は弱く自己抗原を認識するものが多いので、IgM 量が増えると自己抗原を認識する免疫複合体 (抗原とそれに対する抗体の複合体) も増加する。このことが、自己抗体を産生する B 細胞の分化促進を誘導するが、そのために必要な免疫組織 (脾臓) の胚中心における免疫複合体による B 細胞への抗原提示の持続には AIM が必要であることが明らかになった。このように、肥満における AIM・IgM 複合体の増加は肥満による自己抗体産生、そして自己免疫疾患の素因となることが判明した。本研究は文献として、Cell Reports 誌に発表した。

(2-b) 脂肪肝由来肝がんとの関連性

AIM^{-/-}マウスと野生型 (AIM^{+/+}) マウスに高脂肪食を投与し、脂肪肝形成とそれによる NASH (非アルコール性脂肪肝炎) や肝がん (HCC: Hepatocellular carcinoma) への進行における AIM や炎症の役割を解析した。AIM は肥満脂肪組織においては、脂肪分解を誘導することにより慢性炎症を誘発する原因となることがこれまでに示されていた。しかしながら、肝臓においては、肝細胞においても脂肪蓄積の抑制が観察されたが、炎症の顕著な誘導は見られなかった。すなわち、AIM^{-/-}マウスでは野生型よりも顕著に脂肪肝が進行したが、炎症やアポトーシスに関しては AIM の有無によって違いはみられなかった。ところが、驚くべきことに長期間 (1 年間) 高脂肪食を食餌させ続けると、野生型マウスでは脂肪肝にはなるが HCC は形成されないが、AIM^{-/-}マウスにおいてはほぼ 100% HCC を発症した (図 1)。発がんの素因となる炎症や細胞ストレス、アポトーシスには AIM の有無によって違いはなかったことから、AIM は発生した癌細胞を除去する役割があることが示唆された。このことから、AIM によるがん治療・予防法の可能性が示され、本研究は文献として Cell Reports 誌に発表した。

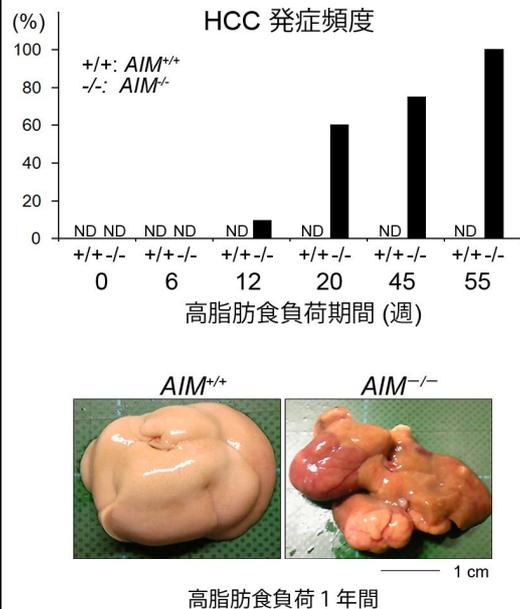


図 1 AIM 欠損による HCC の亢進 (文献より引用・転載)

(3) ヒト血中 AIM 濃度の計測 (大規模コホート)

ヒトにおいては血中 AIM 濃度が様々であるため、ヒト血中 AIM 濃度と生活習慣病の関連性を疫学的に探索するために、健康診断受診健常者約 8000 人および肝がん患者を含む肝疾患患者約 400 人の AIM の血中濃度を測定した。

その結果、血中 AIM 値の平均値は男性 4.9 μg/ml、女性 6.0 μg/ml で、女性の方が有意に高値であった。また、特に女性においては加齢に伴い AIM 値が有意に減少することがわかった (図 2)。

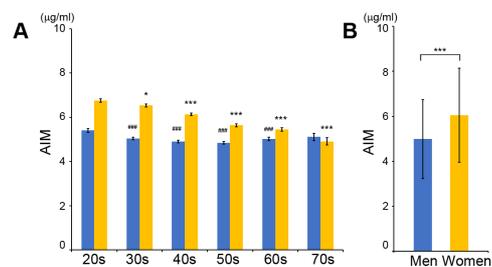


図 2 ヒト血中 AIM 値の年齢による推移 (A) と男女における違い (B) (文献より引用・転載)

肝疾患患者における測定では、各種肝機能マーカー値との比較により、肝障害が進行すると AIM 値も上昇するという結果が得られた。さらに、HCC 患者と非 HCC 患者において AIM 値を比較したが、HCC の有無による AIM 値には有意差は見いだせなかった。しかしながら、各種肝機能値によって AIM 値を

補正することにより、HCC 患者と非 HCC 患者を AIM 値によって区分できる可能性が見出された。この結果は、文献として PLoS ONE 誌に発表した。今後は AIM 値と肝機能マーカーの推移、HCC の発症について継続的に測定を行うことにより、AIM 値と HCC の発がんリスクの関連性を見出すことが出来る可能性がある。

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 14 件)

Miyazaki T, Arai S. Tricking an ancient immune function to eradicate hepatocellular carcinoma. **Mol Cell Oncol**. 2: e985915, 2015 査読有
DOI: 10.4161/23723556.2014.985915
Yamazaki T, Mori M, Arai S, Tateishi R, Abe M, Ban M, Nishijima A, Maeda M, Asano T, Kai T, Izumino K, Takahashi J, Aoyama K, Harada S, Takebayashi T, Gunji T, Ohnishi S, Seto S, Yoshida Y, Hiasa Y, Koike K, Yamamura K, Inoue K, Miyazaki T. Circulating AIM as an Indicator of Liver Damage and Hepatocellular Carcinoma in Humans. **PLOS ONE** 9:e109123, 2014 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0109123
#Maehara N, #Arai S, #Mori M, #Iwamura Y, Kurokawa J, Kai T, Kusunoki S, Taniguchi K, Ikeda K, Ohara O, Yamamura K, Miyazaki T. Circulating AIM Prevents Hepatocellular Carcinoma through Complement Activation. **Cell Rep**. 9:61-74, 2014 (#co-first author) 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.058
Kai T, *Arai S, Yamazaki T, Miyazaki T. Stabilization and augmentation of circulating AIM in mice by synthesized IgM-Fc. **PLOS ONE** 9:e97037, 2014 (*corresponding author) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0097037
Martinez VG, Escoda-Ferran C, Tadeu Simões I, Arai S, Orta Mascaró M, Carreras E, Martínez-Florencia M, Yelamos J, Miyazaki T, Lozano F. The macrophage soluble receptor AIM/Ap16/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression. **Cell Mol Immunol**. 11:343-354, 2014 査読有
DOI: 10.1038/cmi.2014.1
Hamada M, Nakamura M, Tran MT, Moriguchi T, Hong C, Ohsumi T, Dinh TT, Kusakabe M, Hattori M,

Katsumata T, Arai S, Nakashima K, Kudo T, Kuroda E, Wu CH, Kao PH, Sakai M, Shimano H, Miyazaki T, Tontonoz P, Takahashi S. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. **Nat Commun**. 5:3147, 2014 査読有
DOI: 10.1038/ncomms4147.

*Arai S, Miyazaki T. Impacts of the apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) on obesity-associated inflammatory diseases. **Semin Immunopathol**. 36:3-12, 2014 (*corresponding author) 査読有
DOI: 10.1007/s00281-013-0405-5
*Arai S, Maehara N, Iwamura Y, Honda S, Nakashima K, Kai T, Ogishi M, Morita K, Kurokawa J, Mori M, Motoi Y, Miyake K, Matsushashi N, Yamamura K, Ohara O, Shibuya A, Wakeland EK, Li QZ, Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain IgM immune complex on follicular dendritic cells. **Cell Rep**. 3:1187-1198, 2013 (*corresponding author) 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2013.03.006
Mori M, Kimura H, Iwamura Y, Arai S, Miyazaki T. Modification of N-glycosylation modulates the secretion and lipolytic function of Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM). **FEBS Lett**. 586:3569-3574, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.08.017
Iwamura Y, Mori M, Nakashima K, Mikami T, Murayama K, Arai S, Miyazaki T. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) diminishes lipid droplet-coating proteins leading to lipolysis in adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 422:476-481, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.018

新井郷子, 宮崎徹. AIM: 炎症と生活習慣病を繋ぐ分子, **Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌**, pp99-105, 2013
新井郷子, 宮崎徹. マクロファージ由来因子 AIM による生活習慣病の病態制御, **細胞工学**, 31: 1231-1236, 2012
新井郷子, 宮崎徹. アポトーシスと動脈硬化, **動脈硬化予防**, 11:36-41, 2012
新井郷子, 宮崎徹. 肥満から慢性炎症、そして疾患へ - AIM による慢性炎症誘発のメカニズム -, **血管医学**, 13:213-219, 2012

[学会発表](計 12 件)

新井郷子, 宮崎徹. Circulating AIM

prevents hepatocellular carcinoma through complement activation. 第43回日本免疫学会学術集会 2014.12.11 京都
前原奈都美, 新井郷子, 森真弓, 宮崎徹. 肝臓における AIM の補体活性化によるがん除去機構. 第37回分子生物学会年会 2014. 11.26 横浜
山崎智子, 新井郷子, 宮崎徹. ヒトにおける肝障害及び肝がんの指標としての血中 AIM 濃度. 第37回分子生物学会年会 2014. 11.26 横浜
Miyazaki T, Maehara N, Mori M, Arai S. Prevention of hepatocellular carcinoma by circulating AIM through complement activation. Cell Symposium: Hallmark of Cancer. 2014.11.10 Beijing, China
新井郷子 マクロファージ由来タンパク質 AIM による生体の新規恒常性維持機構 第7回食品免疫学会次世代シンポジウム (招待講演) 2014.06.30 東京
Arai S, Honda S, Shibuya A, Li Q, Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM for retaining the immune complex on follicular dendritic cells. 第42回日本免疫学会学術集会 2013.12.11 幕張
Arai S. Obesity-associated autoantibody production requires AIM for retaining the immune complex on follicular dendritic cells. The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium 2013. 2013.12.03. Pohang, Korea
Arai S, Honda S, Shibuya A, Li Q, Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM for retaining the immune complex on follicular dendritic cells. 15th International Congress of Immunology. 2013.08.24. Milan, Italy
Arai S. Obesity-associated autoantibody production requires AIM for retaining the immune complex on follicular dendritic cells. Cell Symposium, Immunometabolism: from Mechanism to Therapy. 2013.06.10. Toronto, Canada
新井郷子, 宮崎徹. Obesity-associated autoantibody production requires AIM for retaining the immune complex on follicular dendritic cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012.12.07 神戸
Arai S, Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM for retaining the immune complex on follicular dendritic cells. EUROPEAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY. 2012. 09.06, Glasgow, Scotland

Arai S, Miyazaki T. A role for macrophage-derived AIM in humoral immune response and obesity-associated autoimmunity. The 99th America Association of Immunology Annual Meeting. 2012.05.08. Boston, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 郷子 (ARAI, Satoko)

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：60422276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮崎 徹 (MIYAZAKI, Toru)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：3039270