

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2017

課題番号：17H06624

研究課題名(和文) 肥満抑制分子AIMのIgMへの結合・解離性がもたらす肥満関連疾患への影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of inseparable association of AIM with IgM on obesity-related diseases

研究代表者

杉澤 良一 (SUGISAWA, Ryoichi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：70803568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：AIMはこれまでに肥満や脂肪肝、NASH肝癌、急性腎障害(AKI)など様々な疾患との関連が明らかになっている。AIMは、健常時はIgM五量体と結合して血中を循環するタンパク質であり、AKI時にはIgMから解離して治癒機構として働く。一方ネコAIMはIgMと強力に結合し、AKI時にもIgMから解離しないため治癒機構が損なわれている。今回、このネコAIMの高親和性に着目し、AIMのIgMからの解離性が他疾患に及ぼす影響を検討した。マウスを用いた検討から、AIMが解離しないことで肥満・脂肪肝の増悪が認められ、他疾患においてもAIMによる治癒機構にAIMのIgMからの解離が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) has been shown to have suppressive functions in a broad range of diseases including obesity, liver steatosis, hepatocellular carcinoma, and acute kidney injury (AKI). AIM is a circulating protein, associate with IgM pentamers under health states in the blood, and during AKI, AIM dissociates from IgM and gains disease repair activity. On the other hand, due to its extremely high binding affinity for IgM, feline AIM rarely dissociates from IgM and AIM-felinized mice (mice which mouse AIM was replaced with feline AIM) exhibited deficient AKI repair as in cats. In this study, we investigated whether AIM activation via its release from IgM is required to ameliorate other diseases. When fed a high-fat diet (HFD), AIM-felinized mice exhibited resulting in more prominent obesity and fatty liver than in wild-type mice. Thus, blood AIM released from IgM contributes to suppression of obesity and fatty liver as in AKI.

研究分野：病態医科学

キーワード：肥満 脂肪肝 肝癌 AIM ネコ

1. 研究開始当初の背景

AIM (Apoptosis inhibitor of macrophage) はマクロファージの産生する分泌タンパク質であり、血中で IgM 五量体と結合して安定化し、血中濃度が維持されている。これまでに肥満や脂肪肝、NASH 肝癌、急性腎障害 (AKI) など様々な疾患との関連性が明らかとなっている。特に AKI 時には AIM は IgM から解離して単量体となって尿中に出現し、その治癒に貢献する。一方でネコでは、ネコ AIM 独自の構造上の特性によって IgM と強力な親和性を有しており、AKI 時にも IgM から解離せず、結果的に AKI からの治癒機構を欠如していることが示された。以上から AIM が疾患時における治癒機構として働くためには、IgM から解離することが重要と考えられた。しかしながら、腎疾患以外の疾患において AIM の IgM からの解離との関連性は明らかになっていない。

肥満や脂肪肝に対して AIM は脂肪細胞や肝細胞に取り込まれて、その脂肪分解を促進することで脂肪蓄積を抑制し、病態を抑制的に制御していることが分かっている。一方で、実際に細胞に取り込まれて機能する AIM の由来については明らかになっていない。すなわち、肥満や脂肪肝といった疾患時にも、AKI 時と同様に血中 AIM が IgM から解離してから細胞に取り込まれることで、制御しているのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、AIM の血中動態と肥満関連疾患における AIM の制御機構の関連性を解明することを目的とする。特に肥満と脂肪肝の制御機構に着目し、脂肪細胞や肝細胞に取り込まれて機能する AIM の由来の探索を行う。AKI 時の知見から、AIM が疾患時に機能的に働くためには、IgM から解離することが重要であると考えられた。本解析を通じて、血中 AIM の IgM との解離と AKI 以外の疾患との関連性を解明することを目指す。

本研究を通じて、AIM による疾患制御機構の詳細についての解明が期待できる。また既に着手されている腎疾患に対する AIM 創薬に合わせて、AIM を用いた治療法確立に向けての応用ならびに新たな知見が得られることが期待される。

3. 研究の方法

本研究ではマウス AIM を欠損し、代わりにネコ AIM を発現する「AIM ネコ化マウス」を軸に、*in vitro* 系・*in vivo* 系をそれぞれ構築し、解析を進める。同マウスは、AKI 時におけるネコの表現型 (AIM が IgM から解離せず、AKI が増悪される) を実証したモデルであり、同マウスと野生型マウスおよび AIM 欠損マウスを比較することで、各疾患における AIM の IgM からの解離の有無による影響を検討可能である。また、本研究では血中 IgM を欠損する Δ S μ マウスも比較対象と

して加えて解析する。 Δ S μ マウスは正常な AIM 産生量を有するものの、血中 IgM の欠損に準じて AIM 血中濃度は低く、血中 AIM を介した疾患治癒機構が働かない・あるいは非常に弱いものとなると考えられる。AIM ネコ化マウスと合わせて比較し、両者が同様の傾向を示す場合には、血中 AIM の重要性を相補的に示唆するものと考えられる。

(1) ネコ AIM の機能性の検討

脂肪細胞や肝細胞では CD36 受容体を介して AIM を取り込み、脂肪滴分解 (Lipolysis) が生じる。まずネコ AIM がマウス AIM と同様にマウス CD36 を介して細胞内に取り込まれることを確認するため、HEK293T 細胞にマウス CD36 を強制発現させた後に AIM を付加し、その取り込みを評価する。また AIM 欠損マウスの脂肪組織に AIM を注入し、マウス脂肪細胞におけるネコ・マウス AIM の取り込みを評価する。

次にネコ AIM がマウス脂肪細胞においてマウス AIM と同等の機能性を有することを確認する。マウス 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させた後に AIM を作用させ、Lipolysis を評価する。

(2) 肥満・脂肪肝モデルでの検討

野生型マウス・AIM 欠損マウス・AIM ネコ化マウス及び Δ S μ マウス (各 8 週齢・雄) に高脂肪食 (HFD) を負荷して、疾患モデルマウスを作成し、その比較解析を行う。

HFD12w における体重・組織重量の評価、脂肪組織および肝臓の解析を通じて、AIM による病態制御機構に対する血中 AIM の解離による影響を検討する。

4. 研究成果

(1) ネコ AIM はマウス CD36 を通じてマウス AIM と同等に細胞内に取り込まれる

マウス CD36 を強制発現させた HEK293T 細胞に、FITC をラベルしたネコ AIM およびマウス AIM を培養上清中に加えて培養し、固定・核染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて AIM の細胞内取り込みを評価した。その結果、ネコ AIM はマウス AIM と同等の取り込みを認めた。

また、AIM 欠損マウス脂肪組織にネコ AIM およびマウス AIM を注入し、3 時間後に安楽死して脂肪組織を包埋し、脂肪組織における AIM の取り込みを免疫組織化学にて評価した。この結果、ネコ AIM はマウス AIM と同等に脂肪組織内に取り込まれていることが確認できた。

(2) ネコ AIM はマウス AIM 同様に Lipolysis を誘導する

マウス 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させた後、AIM を取り込ませて Lipolysis を検討した。AIM 付加後 day6 における Oil-red O 染色から、ネコ AIM とマウス AIM において

同等の脂肪細胞の縮小を認めた。

また、AIM 付加後 day2 における qPCR 解析から、FSP27 をはじめとする関連遺伝子の発現抑制を認めた。

以上から、ネコ AIM はマウス AIM と同等の Lipolysis 誘導能をもち、*in vivo* モデルにおける比較評価を通じて、血中 AIM の IgM からの解離の有無による差異を検討できるものと考えられた。

(3) AIM ネコ化マウスは AIM 欠損マウス同様に高度に肥満する

野生型マウス・AIM 欠損マウス・AIM ネコ化マウス及び $\Delta S\mu$ マウスに HFD を負荷し、負荷後 12 週時点での体重を比較した。この結果、AIM 欠損マウス(AIM^{-/-})・AIM ネコ化マウス(Felinized)及び $\Delta S\mu$ マウスは野生型マウス(WT)に比較して有意に体重の増加が認められ、高度に肥満することが示唆された(図 1)。

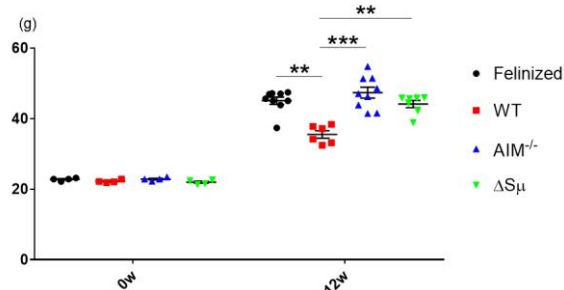


図 1 HFD 負荷による体重変化

また、脂肪組織重量を比較した結果、体重同様に AIM 欠損マウス・AIM ネコ化マウス及び $\Delta S\mu$ マウスは野生型マウスに比較して有意な重量増加が認められ、また脂肪組織の H/E 染色からは、脂肪細胞のサイズも有意に増加していることが示された。

(4) 脂肪組織の脂肪分解を誘導する AIM は血中由来であり、IgM から解離して働く

野生型マウスの脂肪組織における qPCR 解析から、肥満の進行による脂肪組織へのマクロファージの浸潤・増加が *F4/80* の増加から確認された一方で、脂肪組織における AIM の mRNA 発現量は変化しなかった。また主要発現臓器である肝臓と比較して、有意に低値であり、脂肪組織ではほぼ AIM を発現していないと考えられた。すなわち、脂肪組織に作用する AIM は血中由来であると考えられた。

実際に、HFD を負荷した野生型マウスの脂肪組織では、脂肪細胞における AIM の取り込み(免疫組織化学による AIM 陽性)が認められた。しかしながら、ウェスタンブロット法を用いた血清中の AIM 検出では、AKI と異なり AIM の IgM からの解離は検出できなかった。一方で IgM は脂肪細胞では陰性であり、血中で IgM から解離した AIM のみが脂肪細胞と存在していると考えられた。これ

は、AIM が IgM から局所的な解離を起こしていることを示唆していると考えている。なお、後述する HFD 52 週時点では、血中における AIM の IgM からの解離がウェスタンブロット法によって検出されており、肥満および関連疾患の進行によって、AIM の IgM からの解離は促進されると考えられた。

さらに、HFD を負荷した AIM ネコ化マウスの脂肪組織では、AIM の脂肪細胞による取り込みは認められなかった。以上から、野生型マウスでは血中 AIM が IgM から解離して脂肪組織に取り込まれ、肥満抑制に働いていると考えられた。

(5) AIM ネコ化マウスは AIM 欠損マウス同様に脂肪肝が増悪される

次に肝臓重量の比較および解析を行った。脂肪組織と同様に、肝臓重量も AIM 欠損マウス・AIM ネコ化マウス及び $\Delta S\mu$ マウスは野生型マウスに比較して有意な増加が認められた。また、肝臓中のトリグリセリド量を比較した結果、こちらも同様に有意な増加が認められた。

加えて H/E 染色像の評価からも、野生型マウスに比較して AIM 欠損マウス・AIM ネコ化マウス及び $\Delta S\mu$ マウスでは脂肪肝の亢進が示唆された。

(6) 肝臓における炎症・線維化の進行に有意な差は認められない

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は炎症や線維化を伴って肝硬変へ進行する脂肪肝として知られる。qPCR 解析および Sirius red 染色によって、肝臓における細胞ストレス、炎症および線維化の評価を行った。

細胞ストレスの評価は、酸化ストレス(*SOD1*, *Catalase*)、ミトコンドリアストレス(*SOD2*, *Tfam*)、ER ストレス(*CHOP*, *GADD34*, *GRP78*)を評価したが、顕著な差は認められなかった。

同様に炎症マーカー(*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *MCP-1*, *F4/80*, *CD163*, *Arg1*)においても大きな差異は認められなかった。

線維化についても、qPCR 解析による mRNA 発現量(*acta2*, *α SMA*, *TGF β*)および Sirius red 染色像から、差異は認められなかった。

これらは、野生型マウスおよび AIM 欠損マウス間における比較を行った既報と同様の結果であり、AIM は肝硬変への進行に対しては直接的に作用しないことが再確認された。

(7) AIM ネコ化マウスでは、肝癌発症率が抑制される

当初の研究計画に加えて、HFD 負荷 52 週のマウスを用いて、肝癌発症率および発症した肝癌の解析を行った。

これまでに、AIM 欠損マウスでは HFD 負荷 55 週時点でほぼ 100%のマウスが肝癌を

発症することが報告されている。野生型マウスは肝癌を発症しない。その機序として、細胞が癌化すると AIM は癌細胞表面に付着し、その除去を促進することで肝癌発症を抑制していることが明らかになっている。この機構に対し AIM の IgM からの解離が影響するかを検討するため、野生型マウス・AIM 欠損マウス・AIM ネコ化マウスに HFD を 52 週負荷し肝癌発症率を検討した。評価は肉眼観察と癌マーカーである gp73 の染色によって行った。

この結果、AIM 欠損マウスで、ほぼ肝癌の発症が認められ、野生型マウスで発症が認められなかったことに対し、AIM ネコ化マウスでは、肝癌の発症率が抑制されていた(図 2)。

癌部位における免疫組織化学から、AIM 欠損マウスと異なり、AIM ネコ化マウスでは、AIM の付着 (AIM 陽性) とマクロファージの浸潤 (F4/80 陽性) が認められた。

また、血清のウエスタンブロット法による解析から、野生型マウスでは血中での AIM の IgM からの解離が認められた一方で、AIM ネコ化マウスでは解離が認められなかった。すなわち、肥満・脂肪肝の進行による AIM の解離促進に対しても、ネコ AIM は IgM から解離が起こらないものと考えられた。

これらの結果は、血中 AIM の IgM からの解離が肝癌発症抑制に対して主要な働きをしているわけではないことを示唆している。肝臓は脂肪組織と異なり、AIM の主要な産生臓器であり、クッパー細胞が発現・分泌した AIM が直接的に働き、肝癌発症の抑制に貢献している可能性が考えられる。

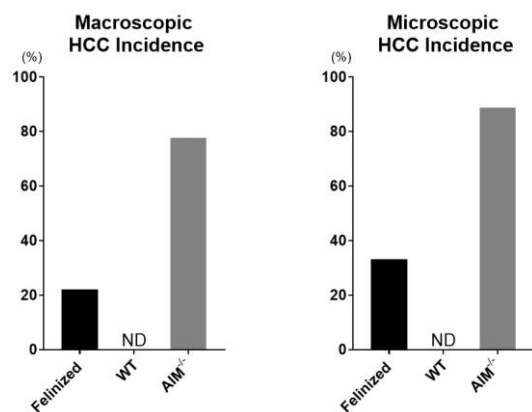


図 2 HFD52 週での肝癌(HCC)発症率

以上から、肥満・脂肪肝に対して作用する AIM は血中由来であり、腎疾患のみならず、これらに対しても IgM からの解離が重要であることが示唆された。また AIM ネコ化マウスの表現型、すなわち肥満・脂肪肝が亢進する一方で、肝癌発症率は低いという結果は、ネコでよく知られる特徴と合致していた。これまでネコにおける肥満・脂肪肝の好発傾向の原因は明らかになっておらず、図らずも、その関連性を示唆するものであった。

本研究成果は Scientific Reports 誌に発表した (文献①)。

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 2 件)

① Sugisawa R, Komatsu G, Hiramoto E, Takeda N, Yamamura K, Arai S, Miyazaki T. Independent modes of disease repair by AIM protein distinguished in AIM-felinized mice. *Sci Rep.* 8, 13157. (2018) 査読有
DOI: 10.1038/s41598-018-31580-6

② Miyazaki T, Yamazaki T, Sugisawa R, Gershwin ME, Arai S. AIM associated with the IgM pentamer: attackers on stand-by at aircraft carrier. *Cell Mol Immunol.* 15, 563-574. (2018) 査読有
DOI: 10.1038/cmi.2017.141

[学会発表] (計 1 件)

① 杉澤 良一、新井 聡子、宮崎 徹、ネコ AIM 独自の IgM 高親和性が肥満病態に及ぼす影響の検討、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017

[その他]

ホームページ等

<http://tmlab.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉澤 良一 (SUGISAWA, Ryoichi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：70803568

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

宮崎 徹 (MIYAZAKI, Toru)

新井 郷子 (ARAI, Satoko)