

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21318

研究課題名(和文)肥満脂肪組織慢性炎症誘導におけるマクロファージ由来リポ蛋白リパーゼの意義

研究課題名(英文)Myeloid lipoprotein lipase determines obesity-induced adipose tissue fibrosis

研究代表者

高橋 学 (Takahashi, Manabu)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70406122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満形成に伴う慢性炎症において、脂肪組織に集積するマクロファージが重要な役割を果たす。マクロファージLpLを欠損したマウスでは肥満を誘導すると白色脂肪組織に顕著な細胞浸潤と線維化を呈した。レプチン欠損ob/obマウスでは、主に皮下脂肪の減少により体重増加が抑制され、糖代謝が改善する一方で、血中のLpL活性が低下し、高トリグリセリド血症を呈した。脂肪組織の機能不全を反映していると考えられた。脂肪組織のマクロファージにおいては、線維化に関わるTGF- β 1やTIMP1、エフェロサイトーシスに関わる遺伝子発現が増加した。マクロファージLpLは脂肪組織の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満形成に伴う慢性炎症において、脂肪組織に集積するマクロファージが重要な役割を果たす。マクロファージLpLを欠損したマウスでは肥満を誘導すると白色脂肪組織に顕著な細胞浸潤と線維化を呈した。その機序として、肥満では脂肪組織マクロファージのLpLが欠損することにより、マクロファージが線維化誘導性に形質転換することによって考えられた。したがって脂肪組織マクロファージLpLは脂肪組織の線維化を抑制することが明らかになった。これらの結果は、脂肪組織線維化のメカニズムの理解を深めるのに有意義なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Macrophages control inflammation and fibrosis in adipose tissues. To understand the role of LpL secreted from adipose tissue macrophages (ATMs) in obesity, we generated leptin-deficient ob/ob mice lacking LpL in myeloid cells (MLpLKO:ob/ob). MLpLKO:ob/ob gained less body weight primarily due to a decrease in subcutaneous fat, ate less food and were more insulin-sensitive, but were more hypertriglyceridemic due to lower LPL activity in post-heparin plasma than ob/ob mice. Notably, MLpLKO:ob/ob showed enlarged crown-like structures and substantial worsening of fibrosis in white adipose tissues. The ATMs from MLpLKO:ob/ob showed increased expression of the genes related to fibrosis (e.g. TGF- β 1 and TIMP1), inflammation and efferocytosis. In conclusion, the loss of myeloid LpL converts the ATMs to a more fibrogenic phenotype, thereby contributing to the extensive fibrosis in adipose tissues and resistance to obesity in ob/ob background.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：肥満 リポ蛋白リパーゼ マクロファージ 炎症 線維化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白リパーゼ(LpL)は主に骨格筋、心筋、脂肪組織において産生され、カイロミクロンやVLDL中のトリグリセライドを水解し、レムナントリポ蛋白やHDLの産生に関わると同時に、組織へ脂肪酸供給を担う。LpLに関する研究は、リポ蛋白代謝の観点では動脈硬化との関わりについて、また脂肪酸代謝の観点では骨格筋、心筋におけるエネルギー代謝及び脂肪組織のLpLと肥満との関わりが注目され解析されてきた。我々の研究室では、LpLと動脈硬化との関連について、動脈硬化モデルマウスに全身性にLpLを過剰発現させるとリポ蛋白代謝の改善により、動脈硬化が抑制されることを報告してきた(Shimada M et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1996., Yagyu H et al. J Lipid Res, 1999.)。一方でマクロファージにおいてもLpLが分泌されており、*in vitro*においてマクロファージ由来LpLは、アポEと共にリポ蛋白(VLDL)の取り込みを促進することを報告した(Ishibashi S et al. J Biol Chem, 1990.)。in vivoでは、骨髄移植法を用いてマクロファージLpLを欠損させたマウスでは、動脈硬化が抑制されることが報告されている(Babaev VR et al. J Clin Invest, 1999.)。以上のことからLpLはリポ蛋白代謝を介した動脈硬化抑制作用と、血管壁における動脈硬化促進作用という二面性を有する。申請者らはCre-loxPシステムによりマクロファージ特異的LpL欠損マウスを作成し、動脈硬化との関連性を検討した。マクロファージLpL欠損マウスは、血漿LpL活性及びリポ蛋白代謝に影響せず、動脈硬化を抑制した。そのメカニズムとして、マクロファージLpLの欠損によるリポ蛋白の取り込み及び泡沫化の抑制と考えられた(Takahashi M et al. J Lipid Res. 54: 1124-34, 2013.)。

脂肪細胞に発現するLpLが脂肪酸の流入を調節する蛋白のひとつであることから、肥満とLpLの関連性について以前より注目されてきた。Cre-loxPシステムを用いて脂肪組織特異的LpL欠損マウスが作成されたが、白色脂肪重量(性腺周囲脂肪、皮下脂肪)、褐色脂肪重量の低下は認めず、骨格筋にLpLが過剰することではじめて白色脂肪重量が低下した(Garcia-Arcos I, Takahashi M et al. J Biol Chem. 288: 14046-58, 2013.)。従って脂肪組織のLpLを単純に調節することで肥満がコントロールできるわけではなく、脂肪組織における内因性の脂肪酸合成、あるいは骨格筋をはじめとした他臓器の脂肪酸の代謝状況が肥満形成に重要であることが明らかになった。

肥満には脂肪組織における慢性炎症が関与している事が近年明らかになり、脂肪組織に集積するマクロファージの役割が注目されている。特に炎症性マクロファージ(M1マクロファージ)が壊死脂肪細胞の周囲に集簇し慢性炎症を引き起こし、さらに線維化を引き起こして脂肪組織の機能不全を来す。その結果、脂肪組織からの脂肪酸放出を促進して肝臓や骨格筋などに脂肪が蓄積し(異所性脂肪)、インスリン抵抗性を惹起し、全身の代謝異常にかかわることが報告されている。しかしながら、脂肪組織の炎症、さらに線維化の分子メカニズムに関して不明な点が多い。

2. 研究の目的

先天的・食餌性肥満マウスにおいて、Cre-loxPシステムを用いてマクロファージLpLを欠損させたところと脂肪組織に顕著に細胞が浸潤し、間質が線維化することを見出した。本研究では、肥満形成における脂肪組織マクロファージLpLの役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

Cre-loxPシステムにより作成されたfloxLpLマウスに、lysozymeプロモーターによりマクロファージにCre蛋白を発現するLysMcreマウスを交配して作成したマクロファージLpL欠損マウス(MLpLKO)、さらに肥満モデルであるob/obマウスと交配し作成したマクロファージLpL欠損ob/obマウス(MLpLKO:ob/ob)を実験に用いた。食餌性肥満モデルでは、8週齢のfloxLpLマウス(fLpL)、MLpLKOマウスに高脂肪食(60 kcal% fat)を16週間負荷し作出した。また先天的肥満モデルでは、MLpLKO:ob/obマウスを通常食で飼育し用いた。体重増加や血漿脂質、糖代謝、脂肪組織の炎症や線維化について評価を行った。

4. 研究成果

① 食餌性肥満モデルでの解析

MLpLKOマウスに、食餌性肥満モデルとして高脂肪食負荷(60 kcal% fat)を4か月行ったところ、対照のfloxLpLと比較して、体重増加に差はなかった。高脂肪食負荷で肥満が誘導されたマウスでは対照群と比較して白色脂肪組織に細胞が浸潤し、間質の線維化の増悪を認めた。脂肪組織のmRNAの遺伝子発現の検討では、floxLpLマウスに高脂肪食を負荷すると、マクロファージのマーカーであるCD68やF4/80の発現が増加し、さらにM1マクロファージのマーカーであるTNF α 、CD11cの発現が増加した。また線維化に関わるTGF β 1やTIMP1の発現が増加した。高脂肪食を負荷したMLpLKOマウスでは線維化マーカーの発現がさらに増加し、組織像に合致する結果であった。しかしながら、肥満誘導が十分でない場合には、線維化が乏しく、表現型が不安定であったため、ob/obマウスでの解析を主体に行った。

②先天的肥満モデルマウス(ob/obマウス)における解析

i) 体重増加

通常食で経時的に体重増加を観察したところ、MLpLKO:ob/obマウスではob/obマウスに比べて、雄は15週齢から、雌は16週齢から有意に体重増加が抑制され、24週齢の時点で、雄、雌

ともに17%体重増加が抑制された(図1)。主に皮下脂肪重量の減少によると考えられた。鼠径部脂肪が雄で34%、雌で28%有意に減少した。さらに雌マウスをシングルケージで飼育し9週齢から摂餌量を測定したところ、MLpLKO:ob/obマウスではob/obマウスに比べて、累計摂餌量は19週齢から有意に少なく、また9週齢から24週齢の摂餌量の合計からから1日あたりの摂餌量を計算したところ、11%有意に減少した(図2)。24週齢の雌マウス視床下部で、摂食に関わるPOMC、AGRP、NPYの遺伝子発現を評価したが差は見られなかった。

ii) 糖代謝と脂質代謝

空腹時血糖値は、fLpL(53 ± 4mg/dl)、MLpLKO(54 ± 4)、ob/ob(120 ± 13)、MLpLKO:ob/ob(90 ± 7)であり、fLpLに比してob/obで有意に血糖値が上昇した(p<0.001)。これに対し、ob/obに比してMLpLKO:ob/obでは有意に血糖値が減少した(p<0.05)。インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRはfLpL(1.2 ± 0.3mg/dl)、MLpLKO(0.8 ± 0.1)、ob/ob(32.5 ± 3.9)、MLpLKO:ob/ob(21.1 ± 1.8)であり、fLpLに比してob/obで有意に上昇した(p<0.001)。これに対し、ob/obに比してMLpLKO:ob/obでは有意に減少した(p<0.05)。随時血糖値においても空腹時血糖値と同様の結果であった(n=7-11)。血漿脂質について、総コレステロールはfLpL(94 ± 3mg/dl)、MLpLKO(87 ± 3)、ob/ob(314 ± 11)、MLpLKO:ob/ob(190 ± 10)であり、fLpLに比してob/obで有意にコレステロールが上昇した

(p<0.001)。これに対し、ob/obに比してMLpLKO:ob/obでは有意にコレステロールが減少した(p<0.001)。一方中性脂肪については、fLpL(95 ± 12mg/dl)、MLpLKO(88 ± 12)、ob/ob(127 ± 13)、MLpLKO:ob/ob(289 ± 47)であり、ob/obに比してMLpLKO:ob/obでは有意に中性脂肪が上昇した(p<0.05)。MLpLKO:ob/obで中性脂肪が上昇したメカニズムについて、ヘパリン静注後のLpL活性を評価したところ、MLpLKO:ob/obではob/obマウスに比べて、45%活性が抑制された。LpL主要産生臓器の骨格筋(大腿筋)、心筋、脂肪組織(精巣上体脂肪)のLpLの遺伝子発現を評価したところ、MLpLKO:ob/obではob/obマウスに比べて、脂肪組織で78%、骨格筋で37%有意に抑制を認めた(図3)。肝臓の脂質含量には差は認めなかった。

iii) 脂肪組織の病理学的評価

肉眼的には、MLpLKO:ob/obマウスでは、ob/obマウスに比べて精巣上体脂肪が茶色調となり、硬化する所見を認めた。間質が増生し、線維化の増悪を認めた。またF4/80陽性細胞で囲まれるcrown like structure(CLS)が増加した(図4)。腎周囲脂肪や皮下脂肪にも性腺周囲脂肪ほどではないが、線維化所見を認めた。

iv) 白色脂肪組織の遺伝子発現

24週齢のマウスで精巣上体脂肪組織の遺伝子発現を評価した。マクロファージのマーカーであるCD68、F4/80はob/obにおいてfLpLより発現が増加した。MLpLKO:ob/obではob/obよりCD68、CD11bの発現は増加したが、F4/80の発現に差は認めなかった。F4/80がよりマクロファージに特異的なマーカーであることから、マクロファージの浸潤には差がないものと考えられた。M1マクロファージのマーカーであるCD11cやTNFα、MCP1はob/obにおいてfLpLより発現が増加した。一方、MLpLKO:ob/obではob/obよりCD11c、IL6の発現が増加したが、TNFα、MCP1と差はなかった。M2マクロファージのマーカーについては、ob/obにおいてfLpLよりIL10の発現が増加する一方Fizz1は低下した。MLpLKO:ob/obではob/obと比較し、CD206は増加したが、IL10やFizz1の発現は低下した。線維化関連に関しては、ob/obにおいてfLpLよりTGFβ1やTIMP1の発現が

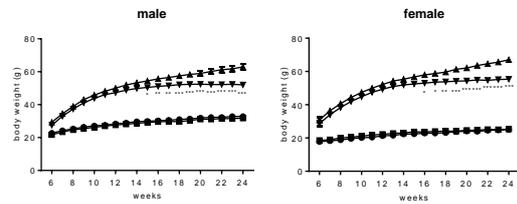


図1. fLpL(●), MLpLKO(■), ob/ob(▲), MLpLKO:ob/ob(▼), (n=9-11)
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, versus MLpLKO:ob/ob mice.

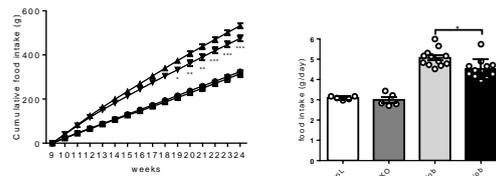


図2. n=5 for fLpL(●), MLpLKO(■), n=12 for ob/ob(▲), MLpLKO:ob/ob(▼).
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, versus MLpLKO:ob/ob mice.

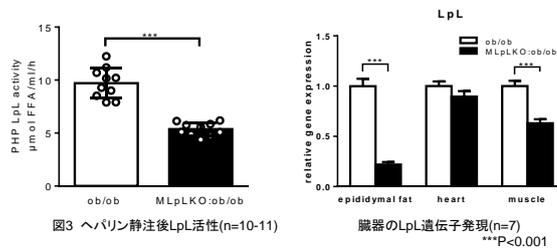


図3 ヘパリン静注後LpL活性(n=10-11)

臓器のLpL遺伝子発現(n=7)
***P<0.001

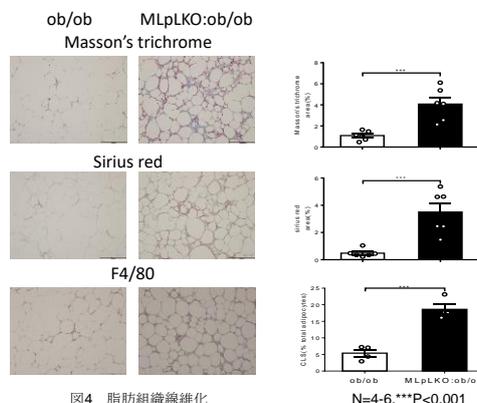


図4 脂肪組織線維化

N=4-6, ***P<0.001

増加したが、Col1a1, Col3a1, Col6a3 の発現が低下した。MLpLKO:ob/ob では ob/ob と比較し、TGF β 1、TIMP1、Col1a1、Col3a1、Col6a3 の発現が増加し、線維化を反映するものと考えられた(図 5)。

v) 脂肪組織マクロファージの遺伝子発現

脂肪組織マクロファージ(ATM)の遺伝子発現を評価するために、磁気細胞分離法で F4/80 陽性細胞を単離し、マクロファージの遺伝子発現を評価した。24 週齢では線維化が強く分離ができなかったため、16 週齢を用いた。

ATM の LpL の発現は MLpLKO:ob/ob で欠失していることを確認した。M1、M2 マクロファージは脂肪組織と同様に一定の傾向を示さなかった。一方で、線維化に関わる HIF1 α 、TGF β 1、TIMP1 は ob/ob に比して MLpLKO:ob/ob で発現が増加した。エフェロサイトーシスに関わる MERTK、LRP1、GAS6 は ob/ob に比して MLpLKO:ob/ob で発現が増加した(図 6)。

vi) 結果のまとめ

ob/ob マウスにおいて、マクロファージ LpL 欠損は、主に皮下脂肪重量の減少を伴い、摂餌量は低下し、体重増加が抑制された。脂肪重量の減少を反映していると想定されるが、インスリン感受性は良好であった。ob/ob マウスに比べて、ヘパリン静注後の血中 LpL 活性が低下し、MLpLKO:ob/ob では中性脂肪が上昇した。脂肪組織の機能不全やマクロファージ LpL 欠損の関与が想定される。MLpLKO:ob/ob では白色脂肪において、線維化の増悪を認めた。ATM の遺伝子発現において、線維化に関連する HIF1 α 、TGF β 1、TIMP1 の発現が増加し、炎症に関わる CD11c、MCP1 の発現が増加した。またエフェロサイトーシスに関わる MERTK や GAS6 などの遺伝子発現が増加した。高脂肪食負荷モデルにおいても、脂肪組織線維化の増悪が確認されている。マクロファージの LpL は壊死脂肪組織の処理に関わっていることが想定され、脂肪組織の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられた。さらにマクロファージ LpL 欠損は、ATM をより線維化惹起性に変化させ、脂肪組織の線維化誘導に関わっていると考えられた。

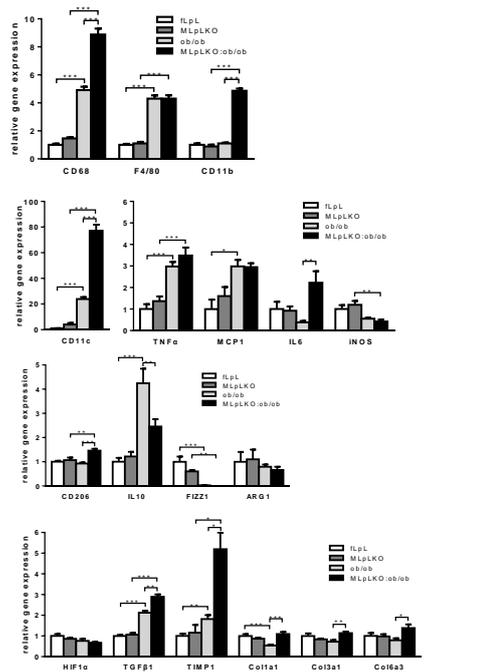


図5 24週齢の精巢上体脂肪の遺伝子発現(n=7) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

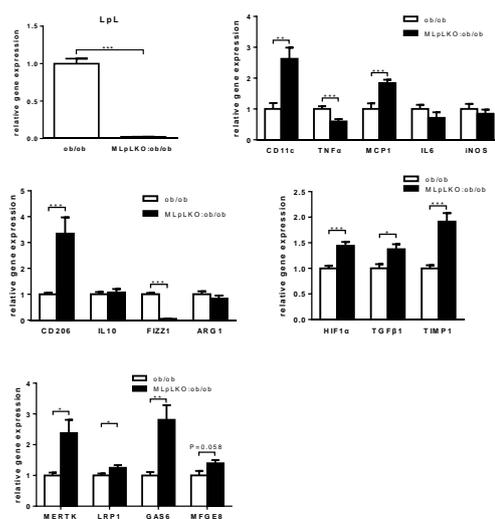


図6 16週齢の精巢上体脂肪組織マクロファージの遺伝子発現(n=6) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 学, 野牛 宏晃, 永島 秀一, 若林 徹治, 山室 大介, 山崎 久隆, 武井 祥子, 武井 暁一, 海老原 健, 石橋 俊
2. 発表標題 肥満脂肪組織慢性炎症誘導におけるマクロファージ由来リポ蛋白リパーゼの意義
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 学, 石橋 俊
2. 発表標題 細胞外トリグリセリド分解と肥満・脂肪組織線維化
3. 学会等名 第40回日本肥満学会・学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----