

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02860

研究課題名(和文) 肥満に伴うM2マクロファージ活性化障害とインスリン抵抗性の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of M2 macrophage activation and insulin resistance associated with obesity

研究代表者

窪田 直人 (Kubota, Naoto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50396719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：M2a-subtypeマクロファージの活性化には、これまで知られていたIL-4/STAT6経路に加えて、IL-4/Irs2/Aktの経路が必須であった。肥満状態ではIL-4/STAT6経路は保たれているが、高インスリン血症によるIRを介したIrs2の発現低下により、選択的にIL-4/Irs2/Akt経路が障害され、その結果、FoxO1/NCoR1/HDAC3のcorepressor complexの安定性が増すことにより、M2a-subtypeマクロファージの活性化が減弱することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理的状态においては、M2a-subtypeマクロファージは脂肪細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられるが、高インスリン血症が持続すると、病的な脂肪細胞肥大化の元凶は脂肪細胞のインスリン感受性を落としM1マクロファージの浸潤や活性化を惹起し、M2a-subtypeマクロファージの活性化も低下するため、インスリン抵抗性を呈するようになると考えられる。高インスリン血症をきたさない治療が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that, the IL-4/Irs2/Akt pathway is selectively impaired, along with decreased macrophage Irs2 expression, although IL-4/STAT6 pathway is maintained. Indeed, myeloid cell-specific Irs2-deficient mice show impairment of IL-4-induced M2a-subtype macrophage activation, as a result of stabilization of the FoxO1/HDAC3/NCoR1 corepressor complex, resulting in insulin resistance under the HF diet condition. Moreover, the reduction of macrophage Irs2 expression is mediated by hyperinsulinemia via the insulin receptor (IR). In myeloid cell-specific IR-deficient mice, the IL-4/Irs2 pathway is preserved in the macrophages, which results in a reduced degree of insulin resistance, because of the lack of IR-mediated downregulation of Irs2. We conclude that downregulation of Irs2 in macrophages caused by hyperinsulinemia is responsible for systemic insulin resistance via impairment of M2a-subtype macrophage activation in obesity.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 肥満

## 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症を制御するマクロファージ (MΦ) は、大きく炎症性サイトカインを分泌する M1 マクロファージ (M1Φ) と抗炎症性サイトカインを分泌する M2 マクロファージ (M2Φ) に分類され、脂肪細胞の肥大化に伴う M1Φ の増加と M2Φ の減少が慢性炎症やインスリン抵抗性の原因とされる (Nat. Rev. Immunol. 11:85, 2011)。肥大化した脂肪細胞は MCP-1 (monocyte chemotactic and activating factor) を産生し M1Φ の浸潤を誘導するとともに、遊離脂肪酸や PAI-1 を分泌し、M1Φ を活性化することが報告されている (Annu. Rev. Immunol. 29:415, 2011)。実際、我々が脂肪組織特異的に MCP-1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製すると、このマウスでは脂肪組織におけるマクロファージ浸潤や TNFα 産生が増加し、インスリン抵抗性が増悪した (J. Biol. Chem. 281:26602, 2006)。一方、M2Φ に関しては、IL-4 による活性化の重要性が報告されている。IL-4 を産生する好酸球を欠損したマウスでは IL-4 の産生低下とともに、インスリン抵抗性、耐糖能異常、慢性炎症が認められ (Science 332:243, 2011)、IL-4 による M2Φ 活性化が障害されている MΦ 特異的 PPARγ 欠損では、肥満に伴う耐糖能異常やインスリン抵抗性、慢性炎症が増悪することが報告されている (Nature 447:1116, 2007)。一連の結果は、M1Φ の活性化とともに、M2Φ の活性低下、特に IL-4 による M2Φa の活性低下が、肥満における慢性炎症やインスリン抵抗性に重要な役割を果たしていることを示唆している。

## 2. 研究の目的

Insulin receptor substrate (IRS) -2 は、骨髄球系細胞において IL-4 によってリン酸化される分子 IL-4-induced phosphotyrosine (4PS) として知られ、クローニングされて 4PS と同一分子であることが明らかとなった (Nature 377:173, 1995)。我々は肥満に伴う高インスリン血症により IRS-2 の発現が低下することを肝細胞や血管内皮細胞で証明しているが (Cell Metab. 13:294, 2011, Nat. Commun. 7:12977, 2016)、肥満マウスの MΦ においても同様に、IL-4 シグナル関連分子では唯一 IRS-2 が肥満マウスで低下しており、MΦ における IRS-2 の発現低下が M2Φa 活性化障害の原因となっている可能性が強く示唆された。そこで本研究では肥満における M2Φa 活性化障害の分子機構とその破綻のメカニズムについて、その全貌を解明する。

## 3. 研究の方法

MΦ 特異的 IRS-2 欠損 (MIRS-2KO) マウスは高脂肪食下において、耐糖能異常、インスリン抵抗性を呈した。そこでまず、脂肪組織における炎症性サイトカイン発現、浸潤 MΦ 量、M1/M2a Φ の量や割合を検討する。さらに脂肪組織を脂肪細胞分画と SVF 分画に分離し、SVF 分画を用いた FACS 解析による M1/M2 マーカー遺伝子の発現を検討する。もし代表的な M2a Φ マーカー遺伝子である Arginase1 や FIZZ1、Ym1、Mgl1 などの減少が認められたら、さらにその活性も測定し、確かに M2a Φ 活性が減弱していることを確認する。さらにシグナル伝達機構を解析するため、IRS-2 の下流に存在すると考えられる、PI3K/Akt/FoxO1 経路について、IL-4 刺激後の Akt のリン酸化レベル、constitutively active (CA) FoxO1 や FoxO1 ノックダウンの系による M2a Φ マーカー遺伝子の発現変化を検討する。我々は既に PI3K 阻害薬の LY294002 の添加により IL-4 による Arginase1 や FIZZ1、Ym1、Mgl1 活性化が減弱していることを確認しており、MIRS-2KO マウスでは PI3K/Akt/FoxO1 シグナルが減弱している可能性が高いと考えていた。さらに FoxO1 を介した発現調節機構を検討するため、代表的な M2a Φ マーカー遺伝子である Arginase1 プロモーター領域をクローニングし、RAW264.7 cells を用いて FoxO1 による活性化を検討するとともに、FoxO1 結合領域を同定し、mutation を入れることでその活性が失われることを確認する。さらにこの領域を用いて CHIP assay を行い、確かに FoxO1 がこの領域に結合することを証明するとともに、EMSA 解析により FoxO1 と complex を形成している分子についても検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 肥満モデルマウスの脂肪組織のマクロファージでは選択的に IL-4/Irs2 経路が障害されている

我々はまず肥満モデルマウスである ob/ob マウスや高脂肪食誘導性肥満モデルマウスのマクロファージで IL-4 誘導性の STAT6 と Irs2 の活性化について腹腔内マクロファージを用いて確認した。IL-4 誘導性の STAT6 のリン酸化は普通食マウスやコントロールマウスと差がなかったが、Irs2 の蛋白レベルの低下とともに、IL-4 誘導性の Irs2 のリン酸化は有意に低下していた。次に脂肪組織のマクロファージにおける Irs2 の発現を確認したところ、ob/ob マウスや高脂肪食誘導性肥満モデルマウスのマクロファージで Irs2 の発現が低下していた。これらのことから肥満のマクロファージにおいて IL-4/Irs2 経路が選択的に障害されていることが明らかとなった。

### (2) MIRS2KO マウスでは IL-4 誘導性の M2a-subtype マクロファージの活性化が減弱し、肝臓と脂肪のインスリン抵抗性を呈する

そこでマクロファージの Irs2 の役割を明らかにするためにミエロイド特異的 Irs2 欠損マウス (MIRS2KO) を作製し検討したところ、肝臓と脂肪のインスリン抵抗性を示した。さらに脂肪細胞について検討したところ、脂肪細胞の大きさには差を認めなかったが、F4/80 陽性の crown-like structure (CLS) の有意な増加と炎症性サイトカインの上昇を認めた。さらに FACS 解析を行うと

M1-type マクロファージの比率が増加し、M2-type マクロファージの比率が低下していた。そこで M1rs2K0 マウスの骨髄由来マクロファージを用いて IL-4 刺激を行ったところ、IL-4 刺激による M2-type マクロファージの活性化は M1rs2K0 マウスにおいて有意に減弱していた。さらに constitutive active FoxO1 を添加すると IL-4 刺激後の M2-type マクロファージの活性化が減弱し、逆に M1rs2K0 マウスの骨髄由来マクロファージで FoxO1 を欠損させると、M1rs2K0 マウスで低下していた IL-4 刺激後の M2a-subtype マクロファージの活性化が改善することを見出した。このことから M1rs2K0 マウスでは、IL-4 による FoxO1 を介した M2a-subtype マクロファージの活性化障害によってインスリン抵抗性が惹起されたと考えられた。しかし FoxO1 は通常、転写活性化に作用する転写因子である。そこで我々は FoxO1 が NCoR1 や HDAC3 と co-repressor を形成しているのではないかと考え検討したところ、FoxO1 は直接 NCoR1 や HDAC3 と結合し、co-repressor complex を形成していることが明らかとなった。すなわち定常状態では FoxO1、NCoR1、HDAC3 が co-repressor complex を形成し、M2a-subtype マクロファージの活性化を抑制しているが、IL-4 の刺激が入ると Irs2 を介して co-repressor complex が乖離して M2a-subtype マクロファージが活性化された。そして M1rs2K0 マウスのマクロファージでは、Irs2 の欠損により IL-4 による co-repressor complex の乖離が起こらないため、M2a-subtype マクロファージの活性化が障害されていた。

### (3)MIRKO マウスは、マクロファージにおける Irs2 の発現と M2a-subtype マクロファージの活性化を増加させ、インスリン感受性を呈する

Irs2 は IL-4R の基質だけでなくインスリン受容体 (IR) の基質でもある。そこでミエロイド特異的 IR 欠損 (MIRKO) マウスも同様の表現型を呈するのではないかと考えられたが、非常に興味深いことに M1rs2K0 マウスと異なり、MIRKO マウスではインスリン感受性を呈していた。脂肪組織においては、脂肪量や脂肪細胞サイズは変化がなかったが、F4/80 陽性の CLS は有意に低下し、炎症性サイトカインの発現が低下していた。FACS 解析を行うと M1-type マクロファージの比率が有意に低下し、一方 M2-type マクロファージの比率が有意に増加していた。そこで我々は MIRKO マウスのマクロファージにおいて IL-4R、STAT6、Irs2 の発現について検討したところ、IL-4R と STAT6 の発現は変化しなかったが、Irs2 が有意に上昇していた。さらに腹腔内マクロファージを用いて検討したところ、IL-4 刺激後の STAT6 のリン酸化は変化なかったが、MIRKO マウスのマクロファージは Irs2 の蛋白発現の増加と共に、IL-4 刺激後の Irs2 のリン酸化が増加していた。マクロファージにインスリンを添加するとコントロールマウスでは Irs2 の発現低下を認めたが、MIRKO マウスのマクロファージでは、Irs2 の発現低下は認められなかった。以上の結果から、MIRKO マウスでは高インスリン血症によるインスリン受容体を介した Irs2 の発現低下を認めなかった結果、IL-4 による Irs2 を介した M2a-subtype マクロファージの活性化が維持され、インスリン感受性を呈したと考えられた。実際インスリンを事前に添加すると Irs2 の発現低下に伴い IL-4 による M2a-subtype マクロファージの活性化が減少した。さらに、マクロファージと 3T3-L1 脂肪細胞の共培養実験では、インスリン添加によるマクロファージの Irs2 発現低下に伴い 3T3L-1 脂肪細胞において炎症性サイトカインの有意な上昇を認め、M2a-subtype マクロファージが脂肪組織と相互作用しながら、抗炎症作用を発揮することが示唆された。

### (4)M2a-subtype マクロファージの活性化は Irs2 と STAT6 経路の両方が必須である

インスリンは IL-4 と同様に Akt をリン酸化するにもかかわらず、インスリンは M2a-subtype マクロファージの活性化を誘導できなかった。このことは IL-4/Irs2/Akt 経路だけでは、M2a-subtype マクロファージの活性化を惹起することができないと考えられた。そこで STAT6 について検討したところ、IL-4 では STAT6 はリン酸化されるが、インスリンは全くリン酸化しなかった。また IL-4 による M2a-subtype マクロファージの活性化が STAT6 を欠損させると減弱した。M1rs2K0 マウスのマクロファージでは IL-4 による STAT6 リン酸化に差を認めなかったが、インスリンによって STAT6 のリン酸化はやはり認められなかった。さらに PI3kinase 抑制薬である LY294002 は IL-4 による Akt のリン酸化は抑制したが、STAT6 のリン酸化は抑制しなかった。これらの結果から、IL-4 は STAT6 と Irs2/Akt シグナルの両方の経路を介して M2a-subtype マクロファージの活性化を誘導することが明らかとなった。

### (5)肥満に伴う慢性炎症における「インスリン失調」仮説

M2a-subtype マクロファージの活性化には、これまで知られていた IL-4/STAT6 経路に加えて、IL-4/Irs2/Akt の経路が必須であった。肥満状態では IL-4/STAT6 経路は保たれているが、高インスリン血症による IR を介した Irs2 の発現低下により、選択的に IL-4/Irs2/Akt 経路が障害され、その結果、FoxO1/NCoR1/HDAC3 の corepressor complex の安定性が増すことにより、M2a-subtype マクロファージの活性化が減弱することが明らかとなった。我々はこれらの結果から肥満状態における慢性炎症において「インスリンの作用失調」が存在するのではないかと考えている。生理的状态において、毎食後の高インスリン血症は、Irs2 がない脂肪細胞では脂肪酸取り込みや糖取り込み促進、脂肪分解抑制を介して脂肪細胞肥大化につながる。一方でマクロファージにおいて、高インスリン血症は Irs2 の発現低下を介して M2a-subtype マクロファージの活性化を減弱させインスリン感受性低下を惹起し、脂肪細胞肥大化のブレーキをかけており、M2a-subtype マクロファージは脂肪細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。組織常在型 M2 様マクロファージに発現する Tribble1 を欠損すると M2a-subtype マクロファージ分化が低下しリポジストロフィーを呈することが報告されており、M2a-subtype

マクロファージは脂肪組織維持に重要な役割を担っていることが示唆されている。一方高インスリン血症が持続すると、病的な脂肪細胞肥大化の亢進は脂肪細胞のインスリン感受性を落としM1マクロファージの浸潤や活性化を惹起し、M2a-subtypeマクロファージの活性化も低下するため、インスリン抵抗性を呈するようになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi M, Ohsugi M, Sasako T, Awazawa M, Umehara T, Iwane A, Kobayashi N, Okazaki Y, Kubota N, Suzuki R, Waki H, Horiuchi K, Hamakubo T, Kodama T, Aoe S, Tobe K, Kadowaki T, Ueki K	4. 巻 38
2. 論文標題 The RNA Methyltransferase Complex of WTAP, METTL3, and METTL14 Regulates Mitotic Clonal Expansion in Adipogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e00116-00118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yanagida Keisuke, Igarashi Hidemitsu, Yasuda Daisuke, Kobayashi Daiki, Ohto-Nakanishi Takayo, Akahoshi Noriyuki, Sekiba Atsushi, Toyoda Tsudoi, Ishijima Tomoko, Nakai Yuji, Shojima Nobuhiro, Kubota Naoto, Abe Keiko, Kadowaki Takashi, Ishii Satoshi, Shimizu Takao	4. 巻 3
2. 論文標題 The G <sub>12/13</sub> -coupled receptor LPA4 limits proper adipose tissue expansion and remodeling in diet-induced obesity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 97293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Tetsuya, Inoue Mariko, Kubota Naoto, Takamoto Iseki, Mineyama Tomoka, Iwayama Kaito, Tokuyama Kumpei, Moroi Masao, Ueki Kohjiro, Yamauchi Toshimasa, Kadowaki Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Downregulation of macrophage Irs2 by hyperinsulinemia impairs IL-4-induced M2a-subtype macrophage activation in obesity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪田 直人、澤田 実佳、高見 真、中村 衣里、前 明日美、鈴木 亮、伊地知 秀明、関根 里恵、山内 敏正、門脇 孝
2. 発表標題 2型糖尿病患者における体組成の特徴に関する検討
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川陽子、長田梨比人、伊地知秀明、関根里恵、赤松延久、野尻佳代、裴成寛、田村純人、有田淳一、富樫順一、金子順一、長谷川潔、窪田直人
2. 発表標題 肝移植後の骨格筋量の増加に対して周術期の栄養摂取が及ぼす影響
3. 学会等名 第36回日本肝移植研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 窪田 直人, 窪田 哲也, 山内 敏正, 門脇 孝
2. 発表標題 「肥満合併症としての肝疾患-NASHと肝細胞癌をどう捉えるか- 肥満に伴う選択的インスリン抵抗性の分子機構 肝臓のmetabolic zonation」
3. 学会等名 第39回日本肥満学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田 実佳, 長谷川 陽子, 高見 真, 関根 里恵, 山内 敏正, 窪田 直人
2. 発表標題 入院糖尿病患者における食事摂取状況の検討
3. 学会等名 第33回日本糖尿病学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相原允一, 窪田直人, 窪田哲也, 林高則, 桜井賛孝, 岩本真彦, 山内敏正, 門脇孝
2. 発表標題 骨格筋におけるインスリン受容体基質の役割の解明
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 窪田 直人、佐々木 元大、笹子 敬洋、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (有)科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 内分泌・糖尿病・代謝内科	

1. 著者名 窪田 哲也、窪田 直人、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (公社)生命科学振興会「医と食」編集部	5. 総ページ数 4
3. 書名 医と食	

1. 著者名 窪田 直人、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)東京医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 腎と透析	

1. 著者名 桜井 賛孝、窪田 直人、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (有)科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 内分泌・糖尿病・代謝内科	

〔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
---------	---------