

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08476

研究課題名(和文) 肥満に伴う脂肪炎症でのマクロファージのリソソーム関連分子myoferlinの機能

研究課題名(英文) Lysosome-related molecule myoferlin on macrophages in adipose inflammation associated with obesity

研究代表者

鷹見 洋一 (Takami, Yoichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90621756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：MYOF KOは若年齢では耐糖能やインスリン感受性の低下を呈したが、高脂肪食負荷では体重および内臓脂肪の増加、脂肪肝が抑制され、耐糖能が維持された。脂肪組織のMYOFは加齢とともに低下するが、高脂肪食負荷によりNFATとともに発現が維持された。また、MYOFは脂肪分化に伴い発現の低下を認めた。脂肪前駆細胞においてMYOFをノックダウンすると増殖と成熟脂肪細胞への分化が抑制された。MYOF KOにおける高脂肪食負荷による肥満の軽減は酸素消費量の増加とマクロファージによる脂肪炎症の軽減を伴っていた。脂肪にMYOFの新規機能として脂肪分化や摂取カロリーに依存する糖代謝への両方向性の機能が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満およびそれに伴う代謝異常は心血管疾患の重要な危険因子であり、食生活の西洋化を認めるわが国においても社会問題の一つである。本研究において、我々はMYOFが脂肪細胞に発現し、前脂肪細胞の増殖や分化に関連し、若年齢のMYOF KOにおいては部分型脂肪異常栄養症様の表現型を呈する一方、高脂肪食負荷による肥満モデルにおいては肥満や糖代謝異常の抑制を認めることが明らかになった。また、MYOFは脂肪組織において摂取カロリーにより発現増加を認め、肥満病態においては増悪因子となる可能性が考えられた。これらのことは成人における肥満病態やそれに伴う代謝異常において治療標的分子になる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Whereas young MYOF KO mice on a normal diet showed aggravated glucose tolerance and insulin sensitivity, those on a HFD showed preserved glucose tolerance with an attenuated gain of body weight, reduced visceral fat deposits, and less severe fatty liver. Adipose MYOF expression was reduced by aging but was restored by an HFD along with retained expression of NFAT transcription factors. Knockdown of MYOF in preadipocytes suppressed proliferation and differentiation into mature adipocytes along with decreased expression of genes involved in adipogenesis. MYOF expression in preadipocytes was reduced with differentiation. Attenuated obesity in MYOF KO mice on an HFD was also accompanied with increased oxygen consumption by an unidentified mechanism and with reduced adipose inflammation due to less inflammatory macrophages. The multifunctional roles of MYOF involve the regulation of preadipocyte function and affect glucose metabolism bidirectionally depending on consumed calories.

研究分野：内分泌・代謝、老年内科

キーワード：myoferlin マクロファージ 脂肪炎症 インスリン抵抗性 脂肪分化 肥満

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、内臓脂肪は単なる脂肪貯蔵臓器だけでなく、様々な生理活性物質を分泌する内分泌臓器であることが明らかにされ、メタボリック症候群における肥満とインスリン抵抗性との関連が着目されている。脂肪組織にはエネルギー貯蔵組織である白色脂肪組織と脂肪を分解して熱産生を促す褐色脂肪組織があるが、メタボリック症候群の病態には、肥大化した白色脂肪細胞でのマクロファージ (M ϕ) を中心とした慢性炎症が基盤にあり、脂肪浸潤した M ϕ が多くの炎症性サイトカインなどの生理活性物質を分泌することで耐糖能障害やインスリン抵抗性などの糖尿病に繋がる病態が形成されることが示されてきた¹。一方、褐色脂肪細胞は熱産生を促すことで肥満を抑制していることが示されている²。

肥満の病態形成過程において肥大化した脂肪細胞が炎症や血流障害に伴う低酸素などによりアポトーシスを起こすとその周囲に炎症性 M ϕ が集簇し、いわゆる crown-like structure (CLS) を形成して、脂肪炎症の中核を担っていることが知られている。そこでは M ϕ よりリソソーム酵素が分泌され、アポトーシスを起こした肥大化脂肪細胞を消化、貪食してそのクリアランスを行っているが、同時に M ϕ は泡沫化し、炎症が増悪、種々の炎症性サイトカインを分泌することで脂肪炎症を更に悪化させ、脂肪融解に伴い放出される遊離脂肪酸も局所及び全身の炎症に関与していると考えられる³。従ってリソソームの開口放出を制御して脂肪融解に関わる分子は、肥満に起因する脂肪炎症及びそれに伴い生じるインスリン抵抗性に対する治療標的分子になり得る。

2. 研究の目的

M ϕ は多くの死細胞を貪食するとリソソーム内で融解し、リソソーム内残渣をリソソーム酵素とともに周囲に開口放出する。我々は M ϕ によるアポトーシス細胞の貪食に関わる分子として MYOF を同定した。MYOF は骨格筋に発現し、これまで筋芽細胞の融合及び骨格筋傷害時の修復に関わる分子として報告されていたが⁴、更に MYOF がリソソーム上にも局在し、リソソームと細胞膜の融合を促進し、リソソーム内残渣やリソソーム酵素の開口放出と周囲組織への傷害に関わっていることを明らかにした⁵。以上より脂肪組織における慢性炎症の病態で M ϕ が担う役割として炎症性サイトカインの分泌による炎症の増悪に加え、MYOF が介するリソソーム酵素による脂肪融解を端緒とする病態の存在の可能性が想定される。つまり、肥満の進展に伴い肥大化した脂肪細胞はアポトーシスを起こし、それを貪食するため遊走してきた M ϕ は MYOF を介してリソソーム酵素を放出、脂肪融解を起こし、中性脂肪の分解により生じた遊離脂肪酸が TLR4 に結合し、M ϕ の炎症及び脂肪炎症を増悪させ、インスリン抵抗性の更なる悪化に繋げていることが想定される。本研究では MYOF KO を用いて脂肪細胞での慢性炎症の進展における MYOF の病態生理機能を解明することで、肥満における糖代謝異常に対する新規治療標的分子としての MYOF の臨床応用の可能性を検討する。

3. 研究方法

- ・動物実験及び食餌について
- ・脂肪組織の組織学的検討
- ・免疫組織学的検討
- ・細胞培養
- ・マウスの糖代謝の評価
- ・マウスの血中中性脂肪及び肝組織の中性脂含量の測定
- ・ELISA 解析
- ・マウスの酸素消費量及び運動活動量の解析
- ・マウスの体温測定及び寒冷刺激実験
- ・Western blot
- ・リアルタイム PCR (qPCR)
- ・統計解析

これらの研究方法の詳細については、本研究に関する申請者らの論文を参照⁶。

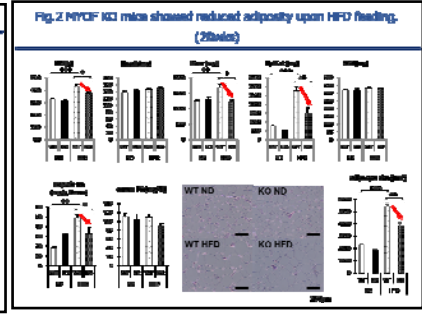
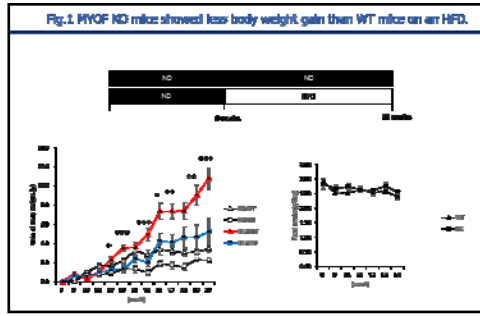
4. 研究成果

肥満病態での M ϕ の MYOF によるリソソームの開口放出と脂肪炎症及びインスリン抵抗性への関連について、in vitro での検討を行うこととした。CRISPR/CAS9 システムにより樹立した MYOF をノックアウトした RAW 細胞を作成し、また、MYOF KO 由来の腹腔 M ϕ を用いても検討した。まず、リソソーム酵素 (Cathepsin B) の分泌を検討したが、コントロールと MYOF をノックアウトした RAW 細胞または腹腔 M ϕ とに差を認めなかった。

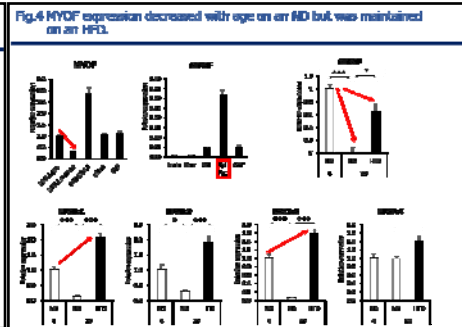
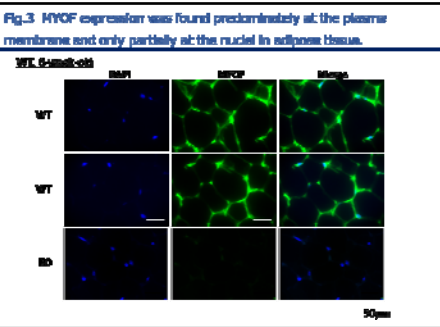
研究開始当初は M ϕ の MYOF の肥満病態での機能について、リソソーム酵素の放出、脂肪融解によるマクロファージの泡沫化に伴う脂肪炎症、インスリン抵抗性の悪化の関与の観点から検討する予定であったが、上記の M ϕ (RAW 細胞、腹腔 M ϕ の MYOF の機能についての実験系は再検討を行うこととしている。

しかし、本研究の経過の中で、MYOF KO において、高脂肪食による肥満が抑制されることが分かり、また、脂肪細胞においても MYOF が発現していることを見出したため、肥満病態における脂肪組織の MYOF の病態生理機能について更なる検討を行うこととした。

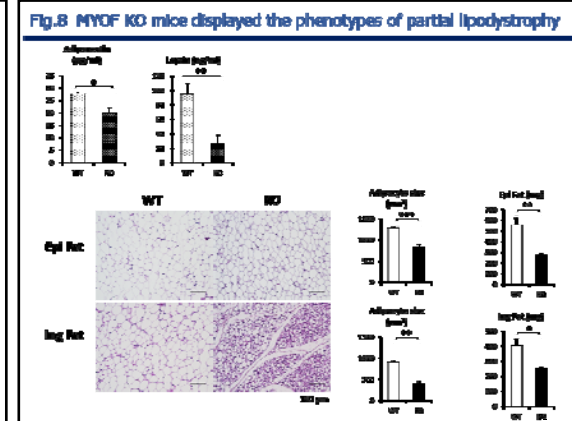
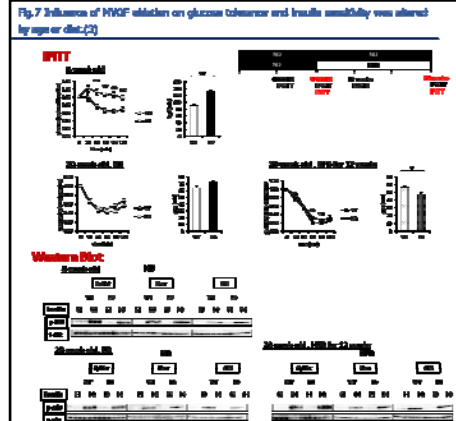
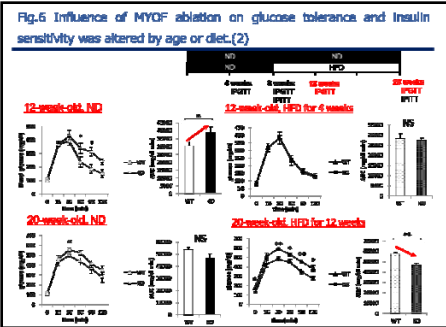
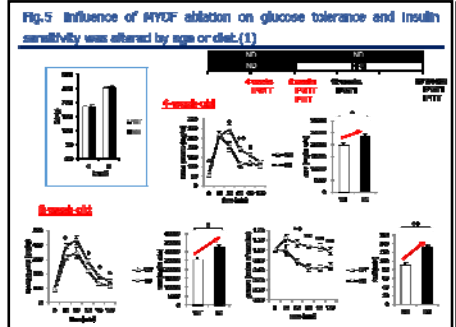
in vivo における検討:



MYOF KO 及び WT の体重を Fig. 1 の如く普通食 (ND) 及び高脂肪食 (HFD) 投与し、経時的に体重を観察すると摂食量は変わらないが、HFDにてMYOF KOの体重増加がWTに比し抑制された。組織重量では特に白色脂肪組織及び肝臓における重量増加が軽減し、脂肪細胞の肥大や脂肪肝の軽減も確認した (Fig. 2)。

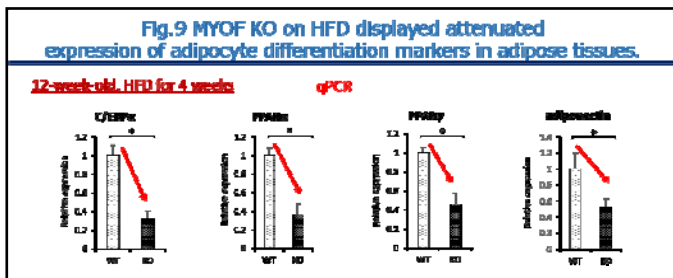


MYOF の脂肪組織における発現を蛍光免疫染色に検討すると細胞膜及び一部、核に発現が認められた (Fig. 3)。MYOF の脂肪組織における発現変化を qPCR にて検討すると、WT において白色脂肪組織における MYOF の発現は普通食では経時的に低下するが、高脂肪食では発現が維持され、MYOF の発現調節をする転写因子として報告がある NFAT の上昇が同時に認められた⁷。(Fig. 4)



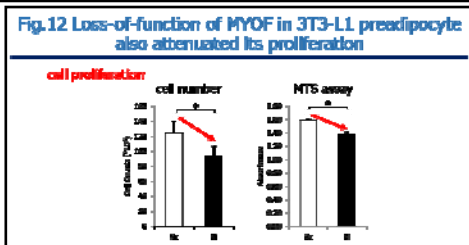
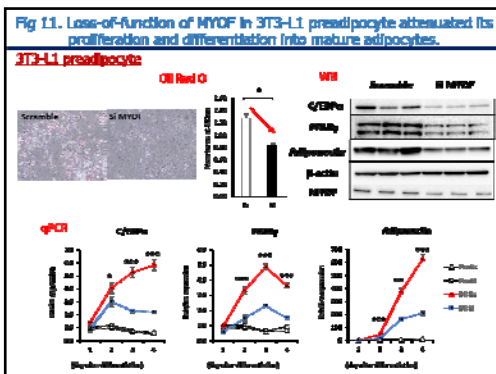
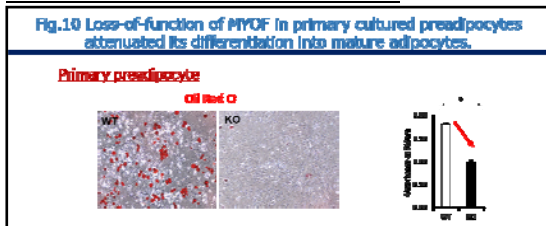
糖代謝能を検討すると、MYOF KO は WT に比して、普通食投与下の若齢のマウスでは糖負荷試験、インスリン負荷試験にて耐糖能障害、インスリン抵抗性を認めたが、高脂肪食では 12 週間投与にて逆に WT が MYOF KO に比し、糖代謝能の悪化を認めた (Fig. 5, 6, 7)。インスリン負荷にて各標的臓器におけるインスリンシグナルの評価として、Akt のリン酸化を検討すると精巢上体脂肪組織 (Epi Fat) のおいてのみ WT と SNCA KO に差が認められ、糖代謝能の結果に一致する結果が得られた。つまり、普通食下の若齢マウスにおいては、MYOF KO にてインスリンシグナルの減弱を認めたが、3 ヶ月間の高脂肪食負荷下では逆に MYOF KO にてインスリンシグナルの改善を認めた (Fig. 7)。この様に、高脂肪食負荷では MYOF KO では肥満が抑制され、糖代謝機能の改善を認めるのに対し、普通食下の若年マウスでは糖代謝異常に加え、Fig. 8 の様に脂肪萎縮、

adiponectin 及び leptin の血中濃度の低下を呈し、部分型脂肪萎縮症様の表現型を呈する。



4週間高脂肪食負荷を行ったマウスの脂肪組織における脂肪分化マーカーを検討すると、MYOF KO ではWT に比して、PPAR、C/EBP、adiponectin の発現が低下していた (Fig. 9)。このことから MYOF は前脂肪細胞における脂肪分化を調節している可能性が考えられた。

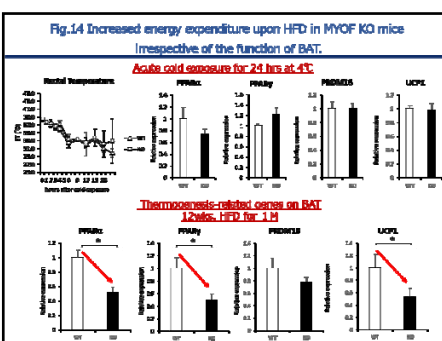
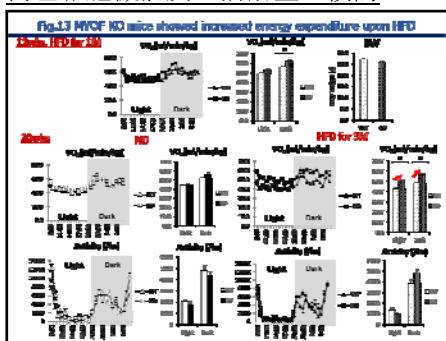
in vitro、ex vivo における検討：



前脂肪細胞の細胞株 3T3L1 をインスリンにより成熟脂肪細胞に分化させると内在性の MYOF の有意な低下を認めた (Fig. 4)。前述の in vivo の結果に基づき、WT 及び SNCA KO の前脂肪細胞の初代培養を行い、インスリンによる脂肪分化を誘導したところ、MYOF KO にて顕著に抑制された (Fig. 10)。また、MYOF を siRNA にてノックダウンした 3T3L1 や MYOF KO から分離した前脂肪細胞はインスリンでの成熟脂肪細胞への分化がコントロールに比して抑制された。同時に脂肪分化マーカーである PPAR や C/EBP、adiponectin の発現も抑制された (Fig. 11)。また、Fig. 12 に示す様に、MYOF の loss-of-function により、前脂肪細胞の増殖も抑制される可能性も考えられた。

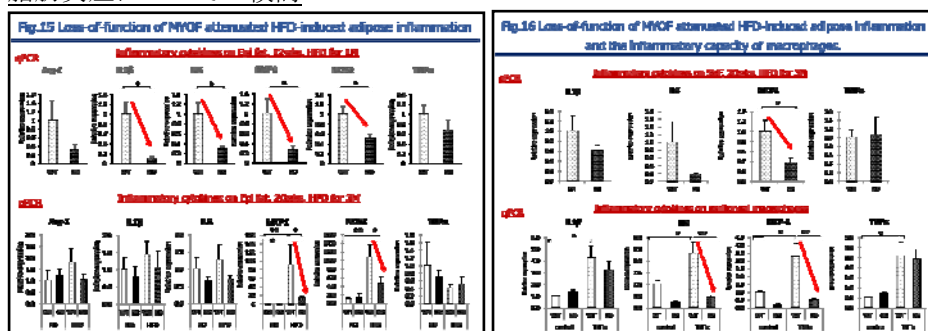
以上より、MYOF は前脂肪細胞において新規機能として細胞増殖及び成熟脂肪分化に関与する可能性が in vitro、ex vivo の検討により考えられ、in vivo における脂肪組織についての表現型に矛盾しない結果を得た。

褐色細胞機能及び活動量の検討：



高脂肪食負荷による肥満モデルにおいて MYOF KO での肥満が軽減される機序として、褐色脂肪機能や中枢性に活動量に変化がないかも検討した。その結果、Fig. 13、Fig. 14 に示すように活動量の変化を伴わず、最大酸素摂取量の増加を認める結果を得た。しかし、褐色脂肪機能については MYOF KO において熱産生に関連する遺伝子 (PPARα、PPARγ、UCP1) の発現は逆に低下を認める相反する結果を得た。寒冷刺激においてはこれらの遺伝子発現は WT に比し、差を認めなかった。インスリンレセプターと IGF-1 レセプターの脂肪特異的ノックアウトマウスでは高脂肪食負荷下での体重増加の抑制、白色脂肪組織の肥大抑制、耐糖能の改善、脂肪分化抑制に加え、酸素摂取量の増加にも関わらず褐色脂肪細胞機能の低下を認めるとの報告があり⁸、MYOF KO の表現型に酷似する。また、MYOF は筋芽細胞においてその融合に関与するが、その分子メカニズムは IGF-1 レセプターの recycling の促進による下流のシグナル伝達の活性化であるとの報告があり⁹、同様の作用がインスリンレセプターについても存在すれば、MYOF KO におけるインス

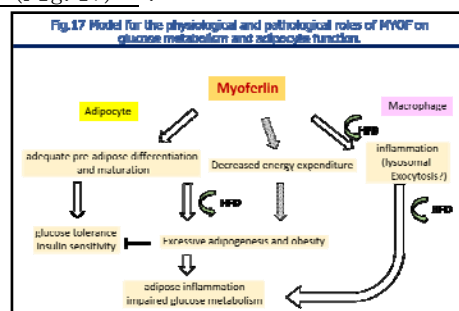
リン及び IGF-1 レセプターのリサイクリング低下に伴う表現型の可能性が考えられた。本仮説の検証のために、脂肪前駆細胞においても同様に MYOF が insulin レセプターの recycling を調節し脂肪分化に関与しているかを検討した。3T3L1 脂肪細胞において MYOF を siRNA にてノックダウンし、インスリンレセプターの発現及びインスリンシグナルをウェスタンブロットにて検討したがコントロール比して有意な差は認めなかった。cycloheximide 投与による検討で MYOF の半減期が長いことが本結果に影響している可能性を考えられ、更なる検討を要する。脂肪炎症についての検討：



高脂肪食下における MYOF KO のインスリン抵抗性悪化の軽減について、脂肪組織での炎症性分子の発現について qPCR にて検討したところ、WT に比し、減少を認めた (Fig. 15)。また、脂肪組織より Stromal Vascular Fraction (SVF) を回収し、炎症性分子の発現を qPCR にて検討したところ、同様に MYOF KO にて低下を認めた (Fig. 16)。更に、WT 及び MYOF KO より腹腔マクロファージを回収し、TNF- α で刺激し、炎症性分子の発現を検討したところ、MYOF KO にて低下を認めた。このことから MYOF はマクロファージにおいても炎症病態に関与し、脂肪炎症に伴うインスリン抵抗性に関与している可能性が考えられた。

MYOF の糖代謝及び脂肪機能における生理的及び病態機能 (Fig. 17) ⁶ :

以上の結果より MYOF の生理的及び病態機能として以下のことが考えられた。MYOF は脂肪組織において生理的には適切な脂肪分化により糖代謝の恒常性に対し、保護的に働く。しかし、高脂肪食負荷による肥満病態では、MYOF は余剰な脂肪細胞増殖や肥大を促進し、耐糖能障害やインスリン抵抗性を悪化させる。また、MYOF は褐色脂肪細胞機能とは関係なく、何らかの機序 (インスリンや IGF-1 レセプターのリサイクリング?) によりエネルギー消費を減少させることで肥満をもたらしている可能性もある。更には、マクロファージにおける MYOF は炎症性サイトカイン分泌の増加に特徴付けられる M1 フェノタイプへ誘導し、脂肪組織における慢性炎症を増悪させる可能性も考えられる。



参考文献：

- Wellen KE and Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1785-8.
- Harms M and Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013;19:1252-63.
- Haka AS, Barbosa-Lorenzi VC, Lee HJ, Falcone DJ, Hudis CA, Dannenberg AJ and Maxfield FR. Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation. *J Lipid Res.* 2016;57:980-92.
- Doherty KR, Cave A, Davis DB, Delmonte AJ, Posey A, Earley JU, Hadhazy M and McNally EM. Normal myoblast fusion requires myoferlin. *Development.* 2005;132:5565-75.
- Miyatake Y, Yamano T and Hanayama R. Myoferlin-Mediated Lysosomal Exocytosis Regulates Cytotoxicity by Phagocytes. *J Immunol.* 2018;201:3051-3057.
- Nozato Y, Takami Y, Yamamoto K, Nagasawa M, Nozato S, Imaizumi Y, Takeshita H, Wang C, Ito Y, Takeda S, Takeya Y, Sugimoto K, Nakagami H, Hanayama R and Rakugi H. Novel properties of myoferlin in glucose metabolism via pathways involving modulation of adipose functions. *FASEB J.* 2020;34:2792-2811.
- Demonbreun AR, Lapidos KA, Heretis K, Levin S, Dale R, Pytel P, Svensson EC and McNally EM. Myoferlin regulation by NFAT in muscle injury, regeneration and repair. *J Cell Sci.* 2010;123:2413-22.
- Boucher J, Mori MA, Lee KY, Smyth G, Liew CW, Macotela Y, Rourk M, Bluher M, Russell SJ and Kahn CR. Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun.* 2012;3:902.
- Demonbreun AR, Posey AD, Heretis K, Swaggart KA, Earley JU, Pytel P and McNally EM. Myoferlin is required for insulin-like growth factor response and muscle growth. *FASEB J.* 2010;24:1284-95.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nozato Y, Takami Y, Yamamoto K, Nagasawa M, Nozato S, Imaizumi Y, Takeshita H, Wang C, Ito Y, Takeda S, Takeya Y, Sugimoto K, Nakagami H, Hanayama R, Rakugi H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Novel properties of myoferlin in glucose metabolism via pathways involving modulation of adipose functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 2792-2811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201901539RR	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野里陽一、鷹見洋一、山本浩一、中神啓徳、華山力成、楽木宏実
2. 発表標題 脂肪分化及び肥満形成におけるMyoferlinの機能解明
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野里陽一、鷹見洋一、山本浩一、中神啓徳、華山力成、楽木宏実
2. 発表標題 肥満病態におけるMyoferlinの新規機能解明
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi Nozato, Yoichi Takami, Hironori Nakagami, Koichi Yamamoto, Rikinari Hanayama, Hiromi Rakugi
2. 発表標題 Myoferlin-mediated lysosomal exocytosis of macrophages regulates obesity-induced adipose inflammation
3. 学会等名 27th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (ISH 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野里陽一、鷹見洋一、中神啓徳、山本浩一、華山力成、樂木宏実
2. 発表標題 Myoferlinは脂肪分化を介して肥満を形成する
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2018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
研究分担者	樂木 宏実 (Rakugi Hiromi) (20252679)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	中神 啓徳 (Nakagami Hironori) (20325369)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	
研究分担者	華山 力成 (Hanayama Rikinari) (40403191)	金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授 (13301)	

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
---------	---------