

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03712

研究課題名(和文) 骨髄細胞コレステロール代謝調節によるインスリン抵抗性・脂肪肝制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of alleviation of insulin resistance and hepatic steatosis by modulating cholesterol metabolism in myeloid cells

研究代表者

石橋 俊 (Ishibashi, Shun)

自治医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：90212919

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)：インスリン抵抗性や脂肪肝におけるマクロファージのHMGCoA還元酵素(Hmgcr)の役割を解明するために、マクロファージ特異的にHmgcrを欠損するマウス(M-HmgcrKO)を作成した。高脂肪食で飼育したM-HmgcrKOでは耐糖能、インスリン感受性、肝臓TG蓄積が改善した。M-HmgcrKOの白色脂肪組織や肝臓ではマクロファージの数が減少した。M-HmgcrKO由来のマクロファージの遊走能は低下しており、低分子G蛋白、RhoAとRac1の活性亢進がその機序と推測された。マクロファージのコレステロール合成経路を標的にした治療が糖尿病や脂肪肝の治療に有効である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肥満・2型糖尿病・非アルコール性脂肪肝の増加が世界的な課題になっている。肥満そのものの改善以外の方法として糖代謝や肝臓を標的にした治療法が開発され、臨床応用されている。しかし、糖代謝異常と脂肪肝の形成に共通な鍵分子を標的にした治療薬の実用化には至っていない。本研究成果は炎症細胞でもあるマクロファージが肥満・2型糖尿病・非アルコール性脂肪肝の病態形成に共通な鍵プレイヤーであり、そのHmgcrを阻害する戦略が2型糖尿病と非アルコール性脂肪肝を同時に改善させることを示唆している。今後、この基盤的知見に立脚した新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of Hmg-CoA reductase (Hmgcr) in macrophages in the development of insulin resistance and hepatic steatosis, we generated mice lacking Hmgcr in macrophages by crossing floxed Hmgcr mice with mice expressing Cre recombinase under the control of lysozyme promoter (M-HmgcrKO). After feeding M-Hmgcr with high fat diet, M-HmgcrKO mice had better glucose tolerance, insulin sensitivity and hepatic steatosis compared with wild-type mice. The number of macrophages were significantly decreased in M-HmgcrKO mice compared with wild-type mice, thereby contributing to reduced inflammation. Macrophages taken from M-HmgcrKO mice had reduced migratory activity compared with wild-type macrophages. Membrane-bound RhoA or Rac1 were increased in the macrophages from M-HmgcrKO mice compared with wild-type macrophages. We speculate that pharmacological or genetic targeting Hmgcr would be a promising strategy to treat metabolic abnormalities in type 2 diabetes and/or obesity.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：マクロファージ 糖尿病 インスリン抵抗性 脂肪肝 コレステロール HMG-CoA還元酵素 低分子G蛋白 肥満

1. 研究開始当初の背景

1) 単球・マクロファージは2型糖尿病や脂肪肝の病態形成に関与する。

2型糖尿病や脂肪肝/NASHの発症における単球・マクロファージをはじめとした免疫細胞の関与が明らかにされている。例えば、肥満に伴って脂肪組織に浸潤するマクロファージ(ATM)は炎症性のM1型の形質を示す。視床下部では、マクロファージと発生学的起源が共通で樹状細胞に類似したミクログリアの増殖と活性化が過食の誘導に重要とされる。

栄養素の代謝は免疫細胞の機能制御にも深く関わる。例えば、ブドウ糖・脂肪酸代謝はマクロファージのM1/M2極性を規定している(Van den Bossche J et al. Trends Immunol 2017;38:395)。M1マクロファージは解糖優位、M2マクロファージは脂肪酸酸化(FAO)優位とされる。更に、脂肪酸合成酵素(FAS)もマクロファージの炎症性変化を規定し、その欠損モデルではインスリン抵抗性と耐糖能が改善すると報告された(Wei X et al. Nature 2016;539:294)。しかし、単球・マクロファージのコレステロール代謝の細胞機能と疾患形成における関与は明らかではなかった。われわれはコレステロール代謝に関わる鍵分子の遺伝子改変マウスを系統的に作成してきた(2.「着想に至った経緯」を参照)。この中で、コレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素(HMGCR)をLysM-Creを用いて骨髓細胞に特異的に除去したマウス(LysM-Hmgcr)の表現型を以下に解説する。

2) マクロファージのHMGCRは動脈硬化を規定する。

LysM-Hmgcr由来の腹腔マクロファージ(MPM)において細胞増殖能と細胞遊走能の低下、小胞体(ER)ストレス化での細胞死とLPS刺激後の炎症性サイトカインの発現亢進などがin vitroで観察された¹。LDL受容体欠損マウス(LDLRKO)背景に高コレステロール食飼育後に形成される動脈硬化病巣はLysM-Hmgcrで改善した。LysM-Hmgcr由来MPMの動脈硬化巣への集積は低下した。一方、動脈硬化巣にKi67陽性細胞は観察されず、TUNEL陽性細胞数も差は認められなかった。従って、動脈硬化病変の縮小には細胞遊走能低下の寄与が大きいといえる。HMGCR阻害薬(スタチン)はコレステロール低下作用とは独立に心血管イベント抑制する可能性が想定され、そうした効果は多面的効果(pleiotropic effects)と呼ばれている。例えば、血管内皮細胞の一酸化窒素(NO)産生促進作用はsmall GTPaseのisoprenylationの低下がGTP結合型の低下を招く結果と解釈されてきた。単球・マクロファージの細胞機能変化もスタチンの多面的効果に寄与している可能性がある。しかし、LysM-Hmgcr由来MPMではRhoAやRac1の細胞膜/細胞質分布比は上昇しており、スタチン処理した血管内皮細胞とは異なる機序が想定された。ラフト(raft)と呼ばれる細胞膜領域は周囲の細胞膜とは異なる脂質組成を有し、細胞膜受容体のシグナル伝達を制御しているため、HMGCRで規定される脂質組成変化が細胞機能を制御している可能性が想定される。また、HMGCRの変化に連動した栄養素代謝の変動も細胞機能機能に影響する可能性がある。

3) マクロファージのHMGCRはインスリン抵抗性と脂肪肝も規定する。

LysM-Hmgcrにおける単球・マクロファージの機能変化は、ATMや視床下部ミクログリアの変化を介して、インスリン抵抗性や過食などに影響する可能性が想定された。そこで、食事誘発性肥満(DIO)モデルを用いて、LysM-Hmgcrの糖・脂質代謝の変化を検討した。体重変化は同等であるにもかかわらず、LysM-Hmgcrの耐糖能とインスリン抵抗性は対照に比較して改善した。インスリンip後の肝臓・白色脂肪組織(WAT)・骨格筋におけるAktのリン酸化はLysM-Hmgcrで亢進していた。

WATのF4/80陽性細胞(ATM)数とcrown-like structure(CLS)はLysM-Hmgcrで著明に減少

し、脂肪肝の大幅な緩和も確認された。肝臓における脂肪酸合成・脂肪酸酸化・リポタンパク分泌に關与する遺伝子発現には変化を認めず、細胞内への脂肪酸の取り込みに關与する CD36 と CD36 の転写制御に關わる PPAR の遺伝子発現が減少していた。

4) マクロファージのスクワレン合成酵素(Fdft1)も動脈硬化・インスリン抵抗性・脂肪肝を規定する可能性がある。

HMGCR はコレステロール合成(ステロール経路)だけでなく、ファルネシルピロリン酸からゲラニルゲラニルピロリン酸、ドリコール、ヘム、ユビキノンも供給する(非ステロール経路)。一方、スクワレン合成酵素(Fdft1)はステロール経路だけを規定する。LysM-Hmgcr の表現型が非ステロール経路の変化よりもラフトの脂質組成や構造等のステロール経路の変化に起因するならば、LysM-Sqs1 も LysM-Hmgcr と類似の表現型を呈する可能性がある。

単球・マクロファージのコレステロール合成経路が、動脈硬化・インスリン抵抗性・脂肪肝改善の有望な治療標的として確立されれば、単球・マクロファージを標的としたドラッグデリバリーシステム(例えば Esterase sensitive motif (ESM) を利用した方法)を援用した薬剤開発により、新しい創薬につながる可能性が期待される。

2. 研究の目的

1) マクロファージ機能変化の機序解明

LysM-Hmgcr 由来の MPM で観察された細胞遊走能低下等の機能変化の分子機序を明らかにする。1) c-Jun amino-terminal kinase (JNK) のリン酸化、2) Small GTPase の変化、3) 解糖・脂肪酸酸化・脂肪酸合成の変化、4) ラフトの脂質組成・蛋白分布の変化を調べる。

2) ATM の減少とインスリン抵抗性改善機序の解明

WAT 以外の臓器(骨格筋、肝臓、視床下部)におけるマクロファージ系細胞の数と活性化状態を組織学的に確認する。Adoptive transfer 実験で、単球・マクロファージの組織移行を評価する。インスリン抵抗性改善の責任臓器を特定する。インスリン抵抗性改善の機序を解明するため、WAT から stromal vascular fraction (SVF)、肝臓から非実質細胞(NPC)を分画し、細胞種や活性化状態等の性状を調べる。

3) 脂肪肝改善機序の解明

Kupffer 細胞を含めた肝臓のマクロファージ系細胞の数と活性化状態を確認する。脂肪酸代謝を評価する。更に、肝臓全体 PPAR と CD36 の発現の差が実質細胞(PC)と非実質細胞(NPC)とどちらの差に起因するかを確認する。PC での CD36 低下が判明した場合には、LysM-Hmgcr 由来のマクロファージがいかに肝細胞の CD36 発現を調節しているかを検討する。

4) HMGCR に特異的な現象か否かの検証

floxed Fdft1 との交配により LysM-Sqs1 を作成し、マクロファージ系細胞の組織分布、マクロファージ機能、耐糖能、インスリン感受性、脂肪肝等の表現型を評価する。

3. 研究の方法

1) **マウス**：LysM-Hmgcr は既に準備済みである。LysM-Fdft1 は LysM-Hmgcr 作成に準じて、LysM-Cre マウスに floxed Fdft1 を交配して作成する。

2) **組織学的検討**：各臓器と血液における単球・マクロファージ系細胞の分布：F4/80、Iba1 (ミクログリア)等をマーカーに用いて免疫染色と FACS で評価する。細胞分裂(Ki67 陽性細胞)とアポトーシス(TUNEL)細胞数を評価する。

3) マクロファージ・肝細胞の代謝・機能解析

MPM、骨髄由来マクロファージ(BMDM)、SVF、肝スライス、肝臓 PC・NPC を用いて検討する。

2-ii) M1/M2 極性、pJNK 発現： FACS・qRT-PCR・Western blot で定量する。

2-iii) 細胞増殖・アポトーシス、遊走・接着・貪食・TLR4 刺激後のサイトカイン産生能を既報に準じて評価する。

2-iv) small GTPase 活性の評価：GTP 結合型を pull down 法(Cytoskeleton)にて評価する。

2-v) ブドウ糖代謝：¹⁴C ブドウ糖の代謝、解糖系酵素と TCA サイクル酵素の発現、必要に応じ中間代謝産物のメタボローム解析を実施する。

2-vi) 脂肪酸合成と 酸化：¹⁴C 酢酸存在下で培養し、コレステロールと脂肪酸への取り込み、DRMs の放射活性を評価する。¹⁴C パルミチン酸の 酸化を定量する。脂肪酸合成と 酸化に関わる酵素群の遺伝子発現を qRT-PCR にて評価し、必要に応じ中間代謝産物のメタボローム解析を実施する。

2-vii) ラフトの単離と解析：DRMs(detergent resistant microdomains)またはショ糖勾配密度勾配超遠心法でラフトを単離し、脂質組成を酵素法と質量分析法で、蛋白分布を Western blot 法で評価する。Giant plasma membrane vesicle(GPMVs) の利用も考慮。

4) 高脂肪食負荷 (DIO モデル)

60%(w/w) ラード含有高脂肪食で飼育し、摂餌量・体重を計測する。摂餌量の変化で説明できない体重の変化を認めただけの場合には代謝ケージにて酸素消費量を評価する。耐糖能はブドウ糖負荷試験で、インスリン感受性はインスリン負荷試験で評価する。各臓器のインスリン感受性はインスリン ip 後の p-Akt/Akt の発現を Western blot で調べる。

5) 遺伝子・蛋白発現解析

炎症性サイトカインと脂質代謝関連遺伝子等を qRT-PCR で定量評価する。必要に応じて、microRNA も含め RNAseq で解析する。Western blot 法にて蛋白・リン酸化蛋白を定量する。pAkt、pJNK、Lyn、moesin、flotillin-1、RhoA、Rac1、Cdc42 等。

6) MPM または BMDM の Adoptive transfer

DiR で蛍光標識した MPM か BMDM を iv 後 WAT(傍精巣上体、腸間膜、腎周囲、皮下)、褐色脂肪組織(BAT)、骨格筋(腓腹筋、ヒラメ筋)、肝臓、視床下部への移行を IVIS で評価する。

7) インスリン感受性の評価

7-i) ブドウ糖の組織取り込み：¹⁴C-2deoxyglucose iv 後の各臓器の放射活性を評価する。

7-ii) グルコースクランプ試験：肝臓でのブドウ糖産生(HGP)低下が想定される場合には hyperinsulinemic euglycemic clamp にて glucose infuse on rate(GIR)と hepatic glucose production (HGP)を評価する。

4. 研究成果

1) LysM-Hmgcr を用いた検討

8週齢の floxed Hmgcr と LysM-Hmgcr を NCD と HFD で 24 週間飼育した。NCD 飼育に比して HFD 飼育は有意に大きな体重増加と eWAT 重量を示した。しかし、体重・eWAT 重量・肝臓重量・摂餌量・CT で評価した皮下脂肪重量・内臓脂肪重量・除脂肪体重・血清 TC・TG・NEFA は floxed Hmgcr と LysM-Hmgcr の間に有意な差が認められなかった。一方、HFD 飼育下では LysM-Hmgcr の空腹時血糖値・インスリン値・HOMA-IR は floxed Hmgcr に比して有意に低値であった。

GTT では LysM-Hmgcr は floxed Hmgcr に比して良好な耐糖能を示し、ITT でも LysM-Hmgcr は floxed Hmgcr に比して高いインスリン感受性を示した。これらの差は NCD では認められなかった。

臓器別のインスリン感受性を比較するために、インスリン静脈注射後の各臓器の Akt^{Ser473} のリン酸化をウエスタンブロットで定量した。肝臓・eWAT・腓腹筋全ての Akt^{Ser473} のリン酸化増加は floxed Hmgcr に比して LysM-Hmgcr で有意に大きかった。

HFD飼育下のeWATにおけるF4/80⁺crown-like structure (CLS)の数を定量すると、floxed Hmgcr に比してLysM-Hmgcrで77%有意に少なかった。マクロファージ一般マーカー (F4/80・Cd68) と M1マーカー (Cd11c・Tnf- α ・Il-1 β ・Il-6・Mcp-1) のmRNA発現はfloxed Hmgcr に比してLysM-Hmgcrで有意に低下した；一方、M2マーカー (Cd206・Cd163) のmRNA発現に差は認められなかった。

HFD飼育下での血清中のアディポネクチン濃度はfloxed Hmgcr に比してLysM-Hmgcrで有意に高値で、TNF α 濃度は有意に低値だった。

マグネティックビーズで単離したF4/80陽性細胞ではHmgcrのmRNA発現は低下していたが、コレステロール代謝関連蛋白 (fdft1・Ldlr・Srebp2) と炎症性サイトカイン (Tnf- α ・Il-1 β ・IL6) のmRNA発現量はfloxed Hmgcr とLysM-Hmgcrとの間に差は認められなかった。

HFD飼育下での肝臓のTG含量はfloxed Hmgcr に比してLysM-Hmgcrで52%有意に低下していた。しかし、eWATとは異なり、肝臓におけるF4/80陽性マクロファージ数やマクロファージ一般マーカー・M1マーカー・M2マーカー遺伝子のmRNA発現量はfloxed Hmgcr とLysM-Hmgcrとの間に差は認められなかった。

次にF4/80陽性マクロファージの遊走能を評価した。MCP-1の受容体であるCcr2のmRNA発現量に差は認められなかった。一方、TGEMsのMCP-1への遊走能はfloxed Hmgcr に比してLysM-Hmgcr で54%有意に低下していた。

この遊走能の低下はBoyden chamberにスクワレンやfarnesyl pyrophosphate(FPP)を添加しても回復しなかったが、mevalonateやgeranylgeranylpyrophosphate(GGPP)を添加すると完全に回復した。

ATMの細胞分裂と細胞死をKi67陽性細胞数やTUNEL陽性細胞数で評価した。どちらの細胞数も floxed Hmgcr とLysM-Hmgcrとの間に差は認められなかった。

2) LysM-Fdft1を用いた検討

上記と同一条件でHFD飼育後の空腹時血糖値・インスリン値・HOMA-IRを測定し、GTTとITTを実施したが、floxed Fpft1とLysM-Fdft1の間で有意な差は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Masayo Isoda, Ken Ebihara, Nagisa Sawayama, Akiko Murakami, Chihiro Ebihara, Koji Shibuya, Akihito Takei, Shoko Takei, Tetsuji Wakabayashi, Daisuke Yamamuro, Manabu Takahashi, Shuichi Nagashima, Shun Ishibashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Leptin sensitizing effect of 1,3-butanediol and its potential mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Report	6. 最初と最後の頁 17691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96460-y	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 Takei S, Nagashima S, Takei A, Yamamuro D, Wakabayashi T, Murakami A, Isoda M, Yamazaki H, Ebihara C, Takahashi M, Ebihara K, Dezaki K, Takayanagi Y, Onaka T, Fujiwara K, Yashiro T, Ishibashi S.	4. 巻 69
2. 論文標題 -Cell-Specific Deletion of HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) Reductase Causes Overt Diabetes due to Reduction of -Cell Mass and Impaired Insulin Secretion.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 2352-2363.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db19-0996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamuro D, Takahashi M, Nagashima S, Wakabayashi T, Yamazaki H, Takei A, Takei S, Sakai K, Ebihara K, Iwasaki Y, Yada T, Ishibashi S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Peripheral circadian rhythms in the liver and white adipose tissue of mice are attenuated by constant light and restored by time-restricted feeding.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0234439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0234439.	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 Takei Akihito, Nagashima Shuichi, Takei Shoko, Yamamuro Daisuke, Murakami Akiko, Wakabayashi Tetsuji, Isoda Masayo, Yamazaki Hisataka, Ebihara Chihiro, Takahashi Manabu, Ebihara Ken, Ishibashi Shun	4. 巻 69
2. 論文標題 Myeloid HMG-CoA Reductase Determines Adipose Tissue Inflammation, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obese Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 158 ~ 164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db19-0076	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 Takahashi M, Yamamuro D, Wakabayashi T, Takei A, Takei S, Nagashima S, Okazaki H, Ebihara K, Yagyu H, Takayanagi Y, Onaka T, Goldberg IJ, Ishibashi S.	4. 巻 298
2. 論文標題 Loss of myeloid lipoprotein lipase exacerbates adipose tissue fibrosis with collagen VI deposition and hyperlipidemia in leptin-deficient obese mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 102322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102322	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 該当する

1. 著者名 Shibuya K, Ebihara K, Ebihara C, Sawayama N, Isoda M, Yamamuro D, Takahashi M, Nagashima S, Ishibashi S.	4. 巻 298
2. 論文標題 AAA-ATPase valosin-containing protein binds the transcription factor SREBP1 and promotes its proteolytic activation by rhomboid protease RHBDL4.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 101936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101936	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永島 秀一, 武井 祥子, 武井 暁一, 原 一雄, 石橋 俊:
2. 発表標題 膵 細胞のHMG-CoA還元酵素欠損は 膵 細胞の減少とインスリン分泌能の低下による糖尿病を誘発する.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病 学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 俊:
2. 発表標題 マクロファージの脂質代謝に魅せられて.
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会, (招待講演)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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