

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07608

研究課題名(和文) 脂質代謝によるマクロファージ分化と肥満の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory role of macrophage differentiation during obesity

研究代表者

川崎 拓実 (Kawasaki, Takumi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：60584414

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)：高脂肪摂取による肥満では、脂肪組織が肥大化し、体重の増大とともに肥満にともなう糖尿病や高血圧などの病態を引き起こす。この肥満状態では脂肪組織内に集積した活性化された炎症性マクロファージ(M1マクロファージ)が集積し、肥満に伴った糖尿病や高血圧などの病態の増悪化にM1マクロファージが寄与していることが報告されている。そこで、脂肪組織内のマクロファージの制御メカニズムを明らかにするため、脂質代謝酵素であるPIKfyveをマクロファージ特異的に欠損したマウスを作製し、高脂肪食を与えた。その結果、PIKfyveがマクロファージの分化を制御することで、肥満の増悪化を制御してい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

食生活の欧米化や運動不足から、肥満の人が急増している。肥満とそれに伴う合併症の発症を抑制するため、様々な研究が行われている。本研究で明らかにしたPIKfyveによりマクロファージの分化制御することで肥満が抑制できることが示唆された。PIKfyveのマクロファージの欠損は脂肪組織内のM1マクロファージへの分化を抑制することで、肥満を抑制していることが明らかとなった。PIKfyveは脂質リン酸化酵素であり、インヒビターによりその機能を抑制できることから、将来、PIKfyveインヒビターを用いた肥満と肥満に伴う合併症の予防に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Obesity induced by high fat intake leads to weight gain and obesity-associated complications such as diabetes and hypertension. It has been reported that activated inflammatory macrophages (M1 macrophages) accumulate in adipose tissue in this obese state. M1 macrophages regulates the exacerbation of pathological conditions such as diabetes and hypertension associated with obesity. To elucidate the regulatory mechanism of macrophage differentiation in adipose tissue, we generated macrophage-specific PIKfyve deficiency mice. PIKfyve is a lipid kinase to generate PtdIns5P or PtdIns3.5P2. These mice were analyzed by feeding a high-fat diet and we found that PIKfyve regulates differentiation to M1 macrophage and controls the progression of obesity.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 マクロファージ 肥満 慢性炎症 PIKfyve

1. 研究開始当初の背景

病原体に侵入により、免疫応答の活性化が誘導され、免疫細胞からのサイトカインの産生に伴って生体防御のための炎症が誘導される。免疫細胞による炎症応答が、原因が除去されても何らかの理由により収束せず持続的に慢性化することを慢性炎症と呼んでいる。慢性炎症を伴う病気として、ぜんそくやアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患、関節リウマチなどの自己免疫性疾患や、肥満などが挙げられる。これら慢性炎症に対する治療には、ステロイド系抗炎症剤を用いることが多い。しかし、ステロイドによる炎症抑制は対処療法的に炎症を抑えるだけで原因の解消に至っていないため、より根本的に効果的な治療方法の開発が望まれている。これまでの我々の研究で慢性炎症とマクロファージの脂質代謝の重要性を明らかにしてきた。そこで本研究では、これまで得られた知見をもとに、慢性炎症の抑制のためのマクロファージの脂質代謝制御を目指して研究を行った。

マクロファージは個々の組織に常在し、個別の機能をもつことで病原体の除去や組織の恒常性維持に貢献している。組織常在性マクロファージはその機能から大きく2つに大別され、炎症抑制性マクロファージ (M2 マクロファージ) は、組織の恒常性維持に寄与している一方、炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) は TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインを分泌することで炎症の増大を引き起こす。この組織常在性マクロファージは、慢性炎症の発症及び収束に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。組織常在性マクロファージの M1/M2 分化のバランスは健康な状態であれば適切に制御されているが、慢性炎症状態の組織においては、M1 マクロファージが優位になり、より炎症の増悪化が引き起こされると考えられている。このマクロファージの状態を制御することにより、慢性炎症の収束を促すことができれば、新しい視点での慢性炎症の治療法方法を提案することができると考えた。

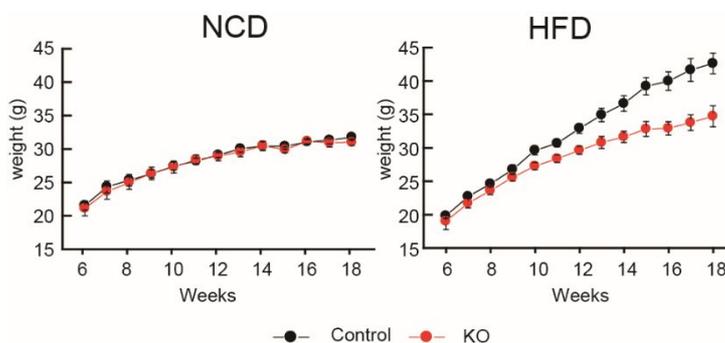


図1 HCD、HFD 投与時の経時的な体重変化
6週令の野生型(Control)及び PIKfyve 欠損(KO)マウスに通常食 (Normal Control Diet (NCD)) (左) 及び高脂肪食 (High Fat Diet (HFD)) (右) を与え、経時的な体重の変化を計測した。* P < 0.05

2. 研究の目的

イノシトールリン脂質は細胞内の微量な脂質でありながら、イノシトール環のリン酸化状態により様々な役割をもつ生理活性物質である。これまで、イノシトールリン脂質代謝酵素である PIKfyve のマクロファージ特異的欠損マウスを用いた研究により、肺組織でのマクロファージの分化とアレルギー炎症の関係を明らかにしてきた。また、最近の研究では、これまで慢性炎症との関連についてはほとんど顧みられなかったが、肥満などの病気でも、慢性炎症が関わっていることが明らかとなってきた。実際に我々の PIKfyve の欠損マウスを用いた研究では、野生型及び PIKfyve 欠損マウスは、通常食では変化がなかったが、高脂肪食を付加することにより肥満を誘導したところ、野生型マウスでは肥満になったものの PIKfyve 欠損マウスでは肥満状態が抑制されていることが明らかとなった (図1)。これらの結果は、イノシトールリン脂質の代謝制御によりマクロファージの分化状態を制御することで慢性炎症を制御できる可能性を示唆していたことから、肥満炎症を制御することによるマクロファージの脂質代謝制御を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

マクロファージ特異的 PIKfyve 欠損マウスにおける肥満抑制メカニズムの詳細は不明であり、PIKfyve がどのようにマクロファージを制御し、また肥満の抑制につながるのかを明らかにすることにした。そこで本研究では、PIKfyve 欠損マウスを用いて脂質代謝によるマクロファージ分化と肥満制御メカニズムの解明を行った。

高脂肪食投与により脂肪組織中では M1 マクロファージが増加し、炎症性サイトカインが産生

されることにより慢性的な炎症が引き起こされ、脂肪細胞の分化の促進や脂肪の蓄積が積極的に起きると考えられている。本研究の先行研究において、野生型は M1 マクロファージの集積が脂肪組織で見られるものの、PIKfyve 欠損マウスでは減少している知見が得られている。この結果は、PIKfyve によるイノシトールリン脂質代謝がマクロファージの M1/M2 分化を制御することにより慢性炎症に影響を与えていることを示唆している。マクロファージ PIKfyve 欠損マウスにおける肥満の抑制メカニズムは、この PIKfyve による M1/M2 分化のバランスの制御によって達成されていると考えていることから、今後、PIKfyve によるイノシトールリン脂質の代謝がどのようにマクロファージの M1/M2 分化を制御しているかを明らかにするため、具体的に以下 4 点について研究をおこなった。

(1) WT 及び PIKfyve 欠損マウスへの HFD の投与
マクロファージ特異的 PIKfyve 欠損マウスが高脂肪食投与による肥満の抑制に寄与しているかを確認するため、6 週令の野生型(Control)及び PIKfyve 欠損(KO)マウスに通常食 (Normal Control Diet (NCD))及び高脂肪食 (High Fat Diet (HFD))を与え、継続的な体重の変化を計測した。

(2)高脂肪食投与による体重増加が、脂肪細胞の増加と肥大化によるものかを明らかにするため、HFD 投与後のマウスから脂肪組織を摘出し、重量の計測と組織切片の作製後、組織の観察をおこなった。

(3)脂肪組織内の免疫応答にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、野生型及び PIKfyve 欠損マウスの脂肪組織中に浸潤する免疫細胞の増減を FACS 解析により検討した。

(4)脂肪組織中のマクロファージを回収し、M1 /M2 マクロファージの割合を明らかにし、また、マイクロアレイにより変動する mRNA を調べることにより、マクロファージの分化状態や関与する遺伝子の同定を行った。

4 . 研究成果

(1)健康な通常状態の脂肪組織内には、炎症抑制性マクロファージ (M2 マクロファージ) が常在し、脂肪組織の恒常性維持に寄与している一方で、肥満状態になると脂肪組織は肥大化し、肥満状態では脂肪組織内に集積した Th1 細胞が分泌した型のインターフェロン (IFN-) によって活性化された炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) が集積している。M1 マクロファージは、TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインを分泌し、インスリンシグナルに影響を与え、インスリン抵抗性を亢進する。好中球に続いて単球も誘引され、脂肪組織内に流入し、炎症性サイトカインをさらに産生することで、脂肪組織内を慢性的な炎症状態にすることが知られている。これまで予備実験として、野生型及び PIKfyve 欠損マウスに高脂肪食 (High Fat Diet (HFD)) を付加することにより肥満を誘導したところ、通常食 (Normal Control Diet (NCD)) では変化がなかったものの野生型マウスでは肥満を誘導できたものの、PIKfyve 欠損マウスでは肥満状態が抑制されていることが明らかとなった (図 1) 。

(2)食事誘導性の肥満が起こることで、脂肪細胞の肥大化に伴う内臓脂肪の肥大化が知られている。そこで、Control 及び PIKfyve 欠損マウスの卵巣周囲脂肪組織を採取し、重量を計測した。その結果、ND を摂餌させた場合では脂肪組織の大きさ、重量に差は見られなかった。一方、HFD を摂餌させた場合では、野生型マウスで脂肪組織が肥大化していたのに対し、PIKfyve 欠損マウスにおいては、肥大化が抑制されていた。次に、HFD 摂餌後の PIKfyve 欠損マウスにおいて、脂肪細胞の肥大化が起きているかを確認するために、パラフィンにより作製した脂肪組織切片の H&E 染色を行った。ND を摂餌させた場合は、野生型及び PIKfyve 欠損マウスの脂肪細胞の大きさに差は見られなかった。HFD を摂餌させた場合では、野生型マウスにおいて脂肪細胞が肥大化しているのに対し、PIKfyve 欠損マウスでは肥大化が抑えられていることが観察された。以上のことから、PIKfyve 欠損マウスにおける体重の抑制は脂肪の蓄積が抑えられていることによることが推察された。

(3)PIKfyve 欠損マウスにおける肥満誘導の抑制と免疫細胞の関与を明らかにするため、脂肪組織内の炎症反応に関与することが知られている好酸球 (Eosinophils : CD45+CD11b+SiglecF+)、好中球 (Neutrophils : CD45+CD11b+Ly6G+) 樹状細胞 (Dendritic cells : CD45+CD11b+CD11c+)、T cells (CD45+CD11b-TCR +)、NK cells (Natural killer cells : CD45+CD11b-NK1.1+)、マクロファージ (Macrophages : CD45+CD11b+F4/80+) の分布をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、NCD 及び HFD を摂餌させたマウスでは、野生型マウスと PIKfyve 欠損マウスの間でこれら免疫細胞の割合に有意な差は認められなかった。

(4)次に、マクロファージをさらに詳しく調べるため、脂肪組織内マクロファージを CD45+CD11b+F4/80+ でゲートした後、さらに CD11c と CD206 を用いて M1

(CD45+CD11b+F4/80+CD11c-CD206+)およびM2(CD45+CD11b+F4/80+CD11c+CD206-)マクロファージとして分離しその割合を解析した。M1マクロファージはHFDによる脂肪組織内に誘導されることがこれまでの研究で示されているが、本研究でも、野生型マウスにおいてM1マクロファージ割合が増加していることが分かった一方、PIKfyve欠損マウスではHFDを摂餌させた場合特に、M1マクロファージの増加が抑制されていた。表面抗原を用いたM1/M2マクロファージの分離ではHFDにより野生型ではM1マクロファージが増加するのに対して、PIKfyve欠損マウスではM1マクロファージの増加が抑制されていた。そこで、次に脂肪組織内のマクロファージの遺伝子発現を網羅的に調べることにより、マクロファージによる慢性炎症について検証した。その結果、野生型マウスではHFDの投与によりマクロファージの遺伝子発現がNCDに比べ顕著に増減する遺伝子が100程度あるが、それら遺伝子の発現の増減はPIKfyve欠損マウス由来マクロファージでは見られなかった。また、炎症性マーカーやマクロファージの分化マーカーの詳細な解析により、PIKfyve欠損マウス由来マクロファージはM1マクロファージへの分化が抑制されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawasaki Takumi, Ikegawa Moe, Kawai Taro	4. 巻 13
2. 論文標題 Antigen Presentation in the Lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 860915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.860915	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 Ong Guang Han, Ori Daisuke, Kawasaki Takumi, Kawai Taro	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of lipopolysaccharide induced inflammatory responses by 1' acetoxychavicol acetate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12943	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 Lian Benedict Shi Xiang, Kawasaki Takumi, Kano Norisuke, Ori Daisuke, Ikegawa Moe, Isotani Ayako, Kawai Taro	4. 巻 25
2. 論文標題 Regulation of I16 expression by single CpG methylation in downstream of I16 transcription initiation site	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104118 ~ 104118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104118	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 Sok Sophia P M, Ori Daisuke, Wada Ayana, Okude Haruna, Kawasaki Takumi, Momota Masatoshi, Nagoor Noor Hasima, Kawai Taro	4. 巻 33
2. 論文標題 1 -Acetoxychavicol acetate inhibits NLRP3-dependent inflammasome activation via mitochondrial ROS suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 373 ~ 386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab016	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 Ong Guang Han, Lian Benedict Shi Xiang, Kawasaki Takumi, Kawai Taro	4. 巻 11
2. 論文標題 Exploration of Pattern Recognition Receptor Agonists as Candidate Adjuvants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 745016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.745016	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 Momota Masatoshi, Nagayama Mizuka, Okude Haruna, Ishii Ken J., Ori Daisuke, Kawasaki Takumi, Kawai Taro	4. 巻 530
2. 論文標題 The Ca ²⁺ -dependent pathway contributes to changes in the subcellular localization and extracellular release of interleukin-33	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 699 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.127	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 Zainol Mohd Izwan Bin, Kawasaki Takumi, Monwan Warunthorn, Murase Motoya, Sueyoshi Takuya, Kawai Taro	4. 巻 9
2. 論文標題 Innate immune responses through Toll-like receptor 3 require human-antigen-R-mediated Atp6v0d2 mRNA stabilization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56914-w	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 Monwan Warunthorn, Kawasaki Takumi, Hasan Md Zobaer, Ori Daisuke, Kawai Taro	4. 巻 521
2. 論文標題 Identification of nucleoporin 93 (Nup93) that mediates antiviral innate immune responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1077 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.035	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 Dewi Pamungkas Putri Dyningtyas, Kawasaki Takumi, Murase Motoya, Sueyoshi Takuya, Deguchi Tomoya, Ori Daisuke, Suetsugu Shiro, Kawai Taro	4. 巻 294
2. 論文標題 PtdIns3P phosphatases MTMR3 and MTMR4 negatively regulate innate immune responses to DNA through modulating STING trafficking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8412 ~ 8423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005731	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 -

〔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 Takumi Kawasaki, Moe Ikegawa, Taro Kawai
2. 発表標題 Alveolar macrophages instruct CD103+CD8+ TRM cells formation via antigen cross-presentation
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Moe Ikegawa, Takumi Kawasaki, Taro Kawai
2. 発表標題 Identification of TXP as a molecule involved in antigen cross-presentation
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Ori, Sophia Sok, Takumi Kawasaki, Masatoshi Momota, Taro Kawai
2. 発表標題 1'-acetoxychavicol acetate inhibit NLRP3-dependent inflammasome activation via mitochondrial ROS suppression
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takumi Kawasaki, Taro Kawai
2. 発表標題 HuR controls cancer-microenvironment to suppress anti-cancer immune responses
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Kawasaki
2. 発表標題 Local CD8+ T cells expansion by tissue resident macrophages
3. 学会等名 Rising Stars in Cutting Edge Immunology Research (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------	---------