

令和 6 年 9 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07355

研究課題名(和文) 過栄養で誘導される視床下部炎症形成におけるミクログリアのダイナミズムの解明

研究課題名(英文) The spatiotemporal dynamics of microglia in the excessive nutrition induced hypothalamic inflammation

研究代表者

付友紀子(Fu, Yukiko)

名古屋大学・環境医学研究所・学振特別研究員(RPD)

研究者番号：20381890

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)：本研究では、過栄養状態で視床下部におけるミクログリア・マクロファージの時空間的動態の解明、または一過性炎症モデルを用いて、中枢MC4Rシグナルが炎症収束過程の肝臓マクロファージに及ぼす影響を検討した。高脂肪食負荷マウスで、視床下部の各神経核においてマクロファージ系細胞の細胞数や活性化状態が変化し、特に室傍核(PVN)にマクロファージ浸潤が観察された。また、中枢のMC4Rシグナルの欠損は肝臓に浸潤するマクロファージのサブタイプ変化を来し、死細胞クリアランスが抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近では、疾患に特異的なサブタイプが報告され(Satoh et al. Nature 2017)、“疾患特異的マクロファージ”の概念が提唱されている。マクロファージの多様性に加えて、栄養・代謝と炎症・免疫の連関を示唆する知見が集積しつつある。視床下部には多数の神経核が複雑に配置されており、末梢の栄養情報を感知して、摂食やエネルギー代謝、自律神経系の活性などを制御する。本研究により、視床下部の各神経核におけるマクロファージ系細胞の質と量の変化が明らかになり、新たな“疾患特異的マクロファージ”の同定に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the spatiotemporal dynamics of microglia and macrophages in the hypothalamus under hypertrophic conditions, and investigated the effects of central MC4R signals on liver macrophages during the inflammatory convergence process using a transient inflammation model. In mice fed a high-fat diet, the number and activation status of macrophage cells changed in each nucleus of the hypothalamus, and macrophage infiltration was observed in the paraventricular nucleus (PVN) in particular. In addition, loss of central MC4R signaling resulted in subtype changes in macrophages infiltrating the liver, and dead cell clearance was suppressed.

研究分野：神経免疫、内分泌

キーワード：視床下部 炎症 ミクログリア 肝障害

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満の病態基盤を成す慢性炎症の分子メカニズムとして、免疫担当細胞の“量”と“質”が注目されている。エネルギー代謝調節中枢である視床下部において、末梢臓器に先行して慢性炎症が生じ、肥満の病態形成に寄与することが明らかになってきた(Valdearcos *et al.* Cell Metab. 2017; Zhang *et al.* Cell 2008)。即ち、栄養過剰状態では、脂肪細胞よりレプチンの分泌が増加し、摂食抑制性 POMC ニューロンの活性化と摂食亢進性 AGRP ニューロンの抑制を介して、体重を一定に保つよう働く。持続的な過栄養は、脳常在性のミクログリアや末梢から浸潤するマクロファージの増加や活性化をもたらす、このフィードバック機構を攪乱するという。しかしながら、ミクログリア・マクロファージ系細胞の視床下部における時空間的動態は、未だ不明の部分が多い。

最近、研究代表者は、消化管で産生されるインクレチンの GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) が、POMC ニューロンにおいてレプチン抵抗性を誘導することを見出し、中枢性エネルギー代謝調節の新たな分子メカニズムを明らかにした(J. Clin. Invest. 2019)。さらに GIP は、視床下部のミクログリアに炎症を惹起することも見出している(Endocrinology. 2020)。即ち GIP は、ニューロンとミクログリアの双方に作用し、視床下部の機能変容を招来すると想定される。POMC および AGRP ニューロンが局在する視床下部弓状核は、血液脳関門を欠くユニークな構造を呈し、種々の栄養素やレプチンなど末梢臓器の栄養情報を受容・応答する一次中枢として知られている。そこで、弓状核に着目して視床下部炎症が研究され、肥満の早期(高脂肪食の負荷開始数日後)よりミクログリアの活性化が生じ、慢性期には末梢からマクロファージ浸潤が増加することが明らかになった(Valdearcos *et al.* Cell Metab. 2017; Cell Rep. 2014)。これに対して、一次中枢から投射を受ける二次中枢の室傍核の組織学的、及び機能的変容については全く分かっていない。

近年、研究技術の進歩により、臓器連関の実態解明が進んできた。しかしながら、視床下部が末梢臓器の炎症をどのように制御するかは、不明の点が多い。室傍核に発現するメラノコルチン 4 型受容体(MC4R)は、レプチンシグナルの下流で摂食抑制やエネルギー代謝の亢進に働く。研究分担者らは、中枢のレプチン-MC4R シグナルが末梢臓器の炎症反応を制御することを報告してきた(J. Neurosci. 2011; Endocr. J. 2010)。さらに、遺伝性肥満を呈する MC4R 欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、肥満やインスリン抵抗性を背景として非アルコール性脂肪肝炎を発症すること(JCI Insight 2017; Am. J. Pathol. 2011)、そのメカニズムとして、MC4R 欠損が浸潤マクロファージの消失を遅延させることを見出した。

このように、過栄養が誘導する視床下部炎症において、ミクログリア・マクロファージ系細胞の役割が明確になってきたが、残された課題として、視床下部におけるミクログリア・マクロファージ系細胞の時空間的動態と視床下部による末梢臓器の炎症制御機構を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、1) CX3CR1-Cre<sup>ERT2</sup> マウスを駆使してミクログリア・マクロファージを時空間的に標識により視床下部におけるミクログリア・マクロファージの時空間的動態の解明、2) 肝細胞障害性の四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)単回投与により、肝細胞死が誘導する一過性炎症モデルを作製し、中枢 MC4R シグナルが炎症収束過程の肝臓マクロファージに及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 視床下部におけるミクログリア・マクロファージの時空間的動態の解明；

本項目では、高脂肪食負荷により誘導される視床下部炎症の形成過程において、脳常在性ミクログリアや末梢由来マクロファージ、さらにこれらの極性変化などを経時的(3日、7日、2週間、4週間)神経核特異的(弓状核、室傍核)に検討した。ミクログリアとマクロファージの区別には、CX3CR1-Cre<sup>ERT2</sup>:tdTomato flox マウスを用いる。即ち、本マウスにタモキシフェンを投与すると、当初はミクログリアと末梢血単球の両方が蛍光標識されるが、常に新たな細胞が骨髄から供給される末梢血単球は4週間後までに非標識のものに置き換わり、ミクログリアとマクロファージを区別することができる。そこで、免疫染色やフローサイトメトリー、レーザーマイクロディセクション法などを用いて、視床下部におけるミクログリア・マクロファージの時空間的動態を解析した。

#### 2) 中枢 MC4R シグナルが炎症収束過程の肝臓マクロファージに及ぼす影響；

肝細胞障害性の四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)を単回投与し、肝細胞死が惹起する急性炎症と炎症収束の過程に及ぼす中枢 MC4R シグナルの影響を検討した。具体的には、MC4R 欠損マウスや MC4R

アンタゴニスト (SHU9119) の脳室内投与により、肝臓に浸潤するマクロファージのサブタイプの変化や死細胞クリアランスを検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 視床下部におけるミクログリア・マクロファージの時空間的動態の解明;

CX3CR1-CreERT2:tdTomato flox マウスを用いて、視床下部においてミクログリアとマクロファージを区別できた (図1)。CX3CR1-CreERT2:tdTomato flox マウスと CX3CR1\_GFP/+; CCR2\_RFP/+ マウスに高脂肪食を4週間負荷の解析で、浸潤マクロファージの寄与は極めて少ないことを確認し、高脂肪食による視床下部の炎症は主にミクログリアの活性化が寄与すると考えられる。

肥満の過程で視床下部の各神経核において、マクロファージ系細胞の細胞数や活性化状態に変化が生じることを見出した。特に、従来知られていなかった室傍核(PVN)におけるマクロファージ系細胞の動態について、脳血管関門を欠く弓状核から離れているにもかかわらず、予想外にマクロファージ浸潤が観察されたことなど、重要な知見を得ている (図2)。室傍核 PVN ではより長期間(8週以上)の高脂肪食負荷しかミクログリアの活性化が認められなかったが、高脂肪食負荷4週間で、PVNで血管周辺マクロファージの形態変化が観察された。

高脂肪食負荷4週間で視床下部 BBB の破綻を色素エバンブルー尾静脈投与マウスで確認できた。これらのことにより、血管周辺マクロファージの形態変化はPVNでのBBB機能破綻およびミクログリアの活性化に関する可能性が示唆された。自律神経の中核となる視床下部 PVN の機能破綻は、自律神経系を經由して末梢臓器の炎症に影響を与えることが考えられる。

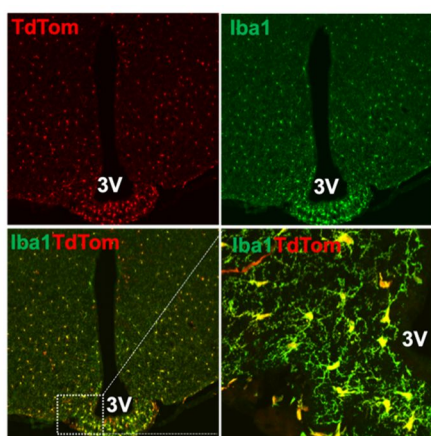


図1 タモキシフェン投与4週間後、視床下部でミクログリア(Iba1+, 緑)はTdTomato+ (赤)とマージする

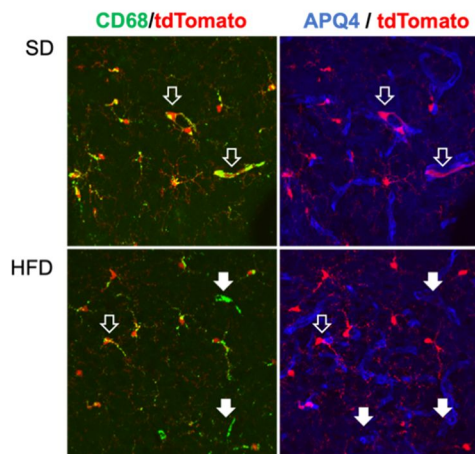


図2 HFD負荷3日後のPVNで末梢由来マクロファージは血管周辺に増加した

##### 2) 中枢 MC4R シグナルが炎症収束過程の肝臓マクロファージに及ぼす影響;

視床下部の機能破綻による末梢臓器への関連作用に関して、四塩化炭素(CCL4)投与による一過性肝炎モデルを用いて、中枢 MC4R シグナルの意義を検討した。MC4R のアンタゴニストを脳室内(ICV)へ投与し、骨髄、末梢血、または肝臓に浸潤するマクロファージの動態と性質をフローサイトメトリーにて解析した。

MC4R シグナルの阻害は肝障害の回復を遅延させる MC4R 欠損マウスでは、CCl<sub>4</sub> 投与5日後に小葉中心性の壊死組織がより多く残存し、その面積は野生型マウスと比べて有意に増加した (図3)。また、MC4R 欠損マウスでは、線維化のマーカである COL1A1 遺伝子の発現が野生型マウスに比べて有意に上昇した。

肝障害回復過程におけるマクロファージサブタイプの変化 CCl<sub>4</sub> 肝障害モデルでは骨髄由来の浸潤マクロファージが増加しており、それは炎症の修復過程で死細胞の貪食などの重要な役割を担っている。骨髄由来マクロファ

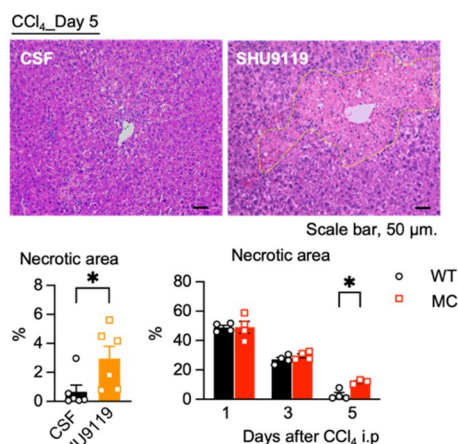


図3 MC4Rシグナルの阻害は肝障害の回復を遅延させる

ージは Ly6C<sup>high</sup> から Ly6C<sup>low</sup> へ分化し、炎症の収束と組織修復に重要であると考えられている。WT と比べて MC4R 欠損マウスでは Ly6C<sup>lo+int/hi</sup> が有意に低下していた (図4)。そのサブタイプの変化は MC4R 欠損マウスの肝障害回復が遅延される一因であると考えられる。

CCl<sub>4</sub> 肝障害モデルの肝臓より分離したマクロファージの貪食実験では pHrodo 陽性細胞の割合と平均蛍光強度 (MFI) は MC4R 欠損マウス由来マクロファージで有意に低下した (図5)

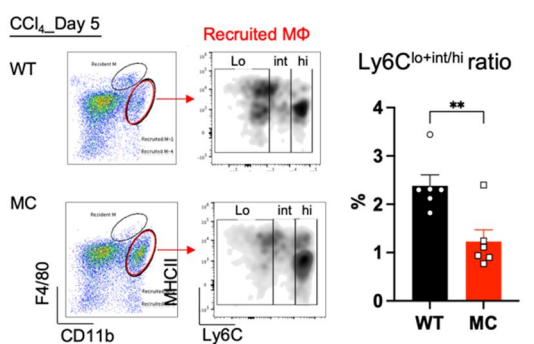


図4 肝障害回復過程におけるマクロファージサブタイプの変化

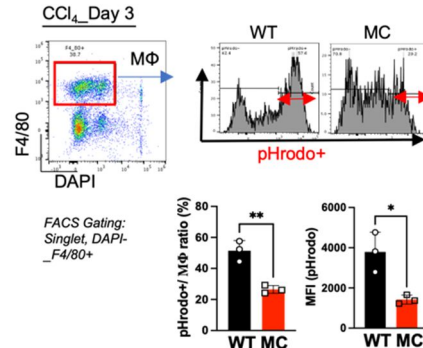


図5 MC4R欠損マウス由来マクロファージの貪食能が低下

本研究では、MC4R 欠損マウスでは肝臓に浸潤するマクロファージのサブタイプが変化すること、死細胞クリアランスが抑制されることを見出した。また肝臓に浸潤するマクロファージの分化制御因子の活性化により肝障害の軽減効果が見られ (未発表データ)、マクロファージのサブタイプは病態形成に重要であることが示唆された。

#### <引用文献>

1. Valdearcos M, Douglass JD, *et al.* Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. *Cell Metab.* 2017;26(1):185-197.e3.
2. Zhang X, Zhang G, Z *et al.* Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 2008;135(1):61-73.
3. Valdearcos M, Robblee MM, *et al.* Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Rep.* 2014;9(6):2124-38.
4. Tanaka M, Suganami T, *et al.* Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B-cell development. *J Neurosci.* 2011;31(23):8373-80.
5. Tanaka M, Suganami T, *et al.* Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration. *Endocr J.* 2010;57(1):61-72.
6. Kaneko K, Fu Y, *et al.* Gut-derived GIP activates central Rap1 to impair neural leptin sensitivity during overnutrition. *J Clin Invest.* 2019 Aug 12;129(9):3786-3791.
7. Fu Y, Kaneko K, *et al.* Gut Hormone GIP Induces Inflammation and Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology.* 2020;161(9):bqaa102.
8. Itoh M, Suganami T, *et al.* CD11c+ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *JCI Insight.* 2017;2(22):e92902.
9. A Itoh M, Suganami T, *et al.* Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2454-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kaneko K*, Lin HY*, Fu Y*, Saha PK, De la Puente-Gomez AB, Xu Y, Ohinata K, Chen P, Morozov A, Fukuda M.*co-first authors	4. 巻 6
2. 論文標題 Rap1 in the VMH regulates glucose homeostasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 e142545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.142545	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 Fu Yukiko, Kaneko Kentaro, Lin Hsiao-Yun, Mo Qianxing, Xu Yong, Suganami Takayoshi, Ravn Peter, Fukuda Makoto	4. 巻 161
2. 論文標題 Gut Hormone GIP Induces Inflammation and Insulin Resistance in the Hypothalamus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqaa102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqaa102	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 付友紀子
2. 発表標題 中枢MC4Rシグナルによる肝臓の炎症慢性化機構.
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会. 2022.11. 名古屋. (口演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 付友紀子、菅波孝祥、福田 真
2. 発表標題 インクレチンGIPは視床下部において炎症促進とインスリン抵抗誘発に働く
3. 学会等名 第10回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Fu, Michiko Itoh, Miyako Tanaka, Bin Fu, Kozue Ochi, Sayaka Kanai, Takayoshi Suganami.
2. 発表標題 Central melanocortin 4 receptor (MC4R) signal regulates chronic inflammation in the liver.
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術会. 2023.6. 名古屋. (口演)
4. 発表年 2023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	菅波 孝祥  (Suganami Takayoshi)  (50343752)	名古屋大学・環境医学研究所・教授    (13901)	

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