

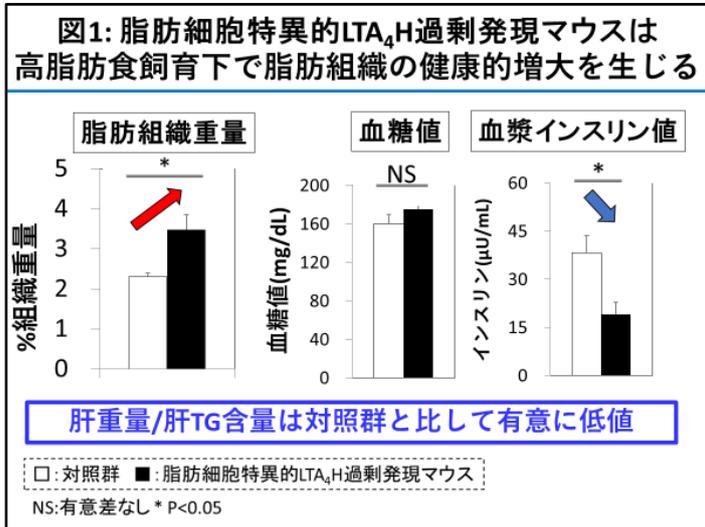
「脂肪組織の健康的増大機構の解析」

神戸大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌内科学

細川 友誠

1 研究の背景と目的

われわれは、これまでに、脂肪細胞におけるインスリン作用の抑制が PDK1-FoxO1 経路を介して LTB₄ の産生を促し、脂肪組織で産生された LTB₄ が遠隔臓器でインスリン作用障害を引き起こすという、新規なシグナルクロストーク/臓器相関によるインスリン抵抗性発症機構を明らかとした (Proc Natl Acad Sci U S A. 117 :21, 2020)。この研究を基盤に、インスリン抵抗性発症における脂肪組織



での LTB₄ 産生の意義を更に検討するため、脂肪細胞特異的 LTA₄H 過剰発現マウスを作成した。本マウスは高脂肪食で飼育すると、脂肪組織重量が対照より増大する一方、肝臓重量や肝臓の脂肪蓄積の増加は抑制され、血漿インスリン値は有意に低かった(図 1)。これは、過剰エネルギー摂取下でも脂肪組織が「健康的」に増大することにより、異所性脂肪の蓄積抑制などを通じて代謝異常の発症が抑制される、いわゆる「脂肪組織の健康的増大」が生じていることを示唆する。本研究は、脂肪細胞特異的 LTA₄H 過剰発現マウスおよび脂肪組織の健康的増大を伴う高度肥満者の血漿・脂肪組織の包括的リポドミクス解析や網羅的遺伝子発現解析など詳細な評価を通じ、LTA₄H が「脂肪組織の健康的増大」をもたらす機構を明らかにすることを目的とした。

2 研究方法・研究内容

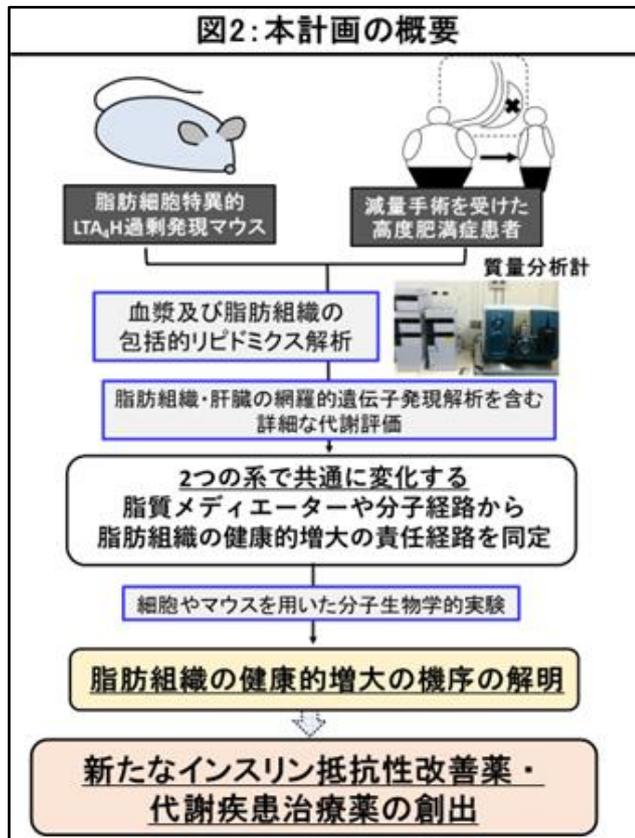
実験計画 1. 脂肪細胞特異的 LTA₄H 過剰発現マウスの代謝表現型の解析

我々が作成した脂肪細胞特異的 LTA₄H 過剰発現マウスは「脂肪組織の健康的増大」を呈しており、まずは本マウスの代謝表現型の詳細な解析を通じて、LTA₄H がどのような機構で「脂肪組織の健康的増大」に関わるかを明らかとすることを目標とする。LTA₄H は Leukotriene A₄ を水解して LTB₄ を産生する活性を持つ酵素であるため、本マウスの代謝表現型には、脂肪組織における脂質メディエーターの産生変化に関わる可能性が高い。そこでまずは、申請者らの施設が確立している LC-MS/MS を用いた包括的リポドミクス解析システムを活用し、機能性脂質の定量的分析を行う。具体的には、高脂肪食飼育下の脂肪細胞特異的 LTA₄H 過剰発現マウス及び対象マウスについて、血漿、脂肪組織の包括的リポドミクス解析を行う。さらに、脂肪組織の RNA-seq 解析、フローサイトメトリーを用いた免疫細胞浸潤も評価し、これらを通じて LTA₄H を介した脂肪組織の健康的増大に関わる可能性のある候補分子や経路を抽出する。その後、得られた候補分子の機能について培養細胞実験で評価する。脂肪組織

の健康的増大に関連する機能が確認できた候補分子について、他の肥満・インスリン抵抗性動物の試料を用いてその変化を解析し、それらの候補分子のインスリン抵抗性や代謝改善における普遍性に関する知見を収集する。

実験計画 2. 高度肥満症患者の内臓脂肪組織及び血漿試料における代謝表現型の解析

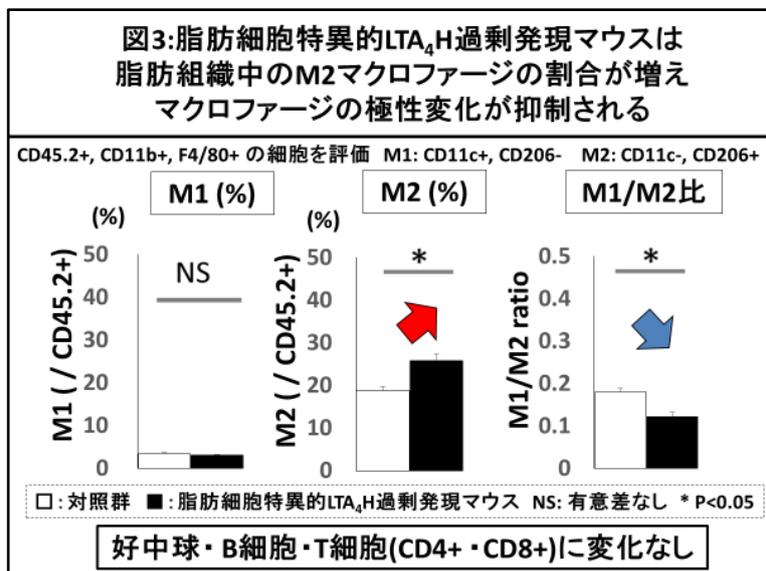
ヒトにおいて、肥満を呈しても代謝異常を示さない metabolic healthy obesity と呼ばれる病態が存在するが、このような病態では脂肪組織の健康的増大が生じていると考えられる。そこで、減量外科治療を受ける高度肥満症患者の手術時に内臓脂肪組織を採取し、さらに術前および術後1年間に亘り経時的に血漿試料の採取を行う。試料収集を完了した40症例について、代謝異常を伴う「非健康的脂肪組織増大群」と代謝異常を伴わない「健康的脂肪組織増大群」に分類し、各群の臨床特性を解析する。また、内臓脂肪組織の包括的リポミクス解析及び脂肪組織のRNA-seq解析を実施し、マウスの結果と比較解析を行う。さらに、この過程で抽出された候補分子・遺伝子の機能について肥満患者試料を用いて検証することで、「脂肪組織の健康的増大」が生じる分子機構の解明を目指す(図2)。



3 研究成果

実験計画 1. 脂肪細胞特異的LTA₄H過剰発現マウスの代謝表現型の解析

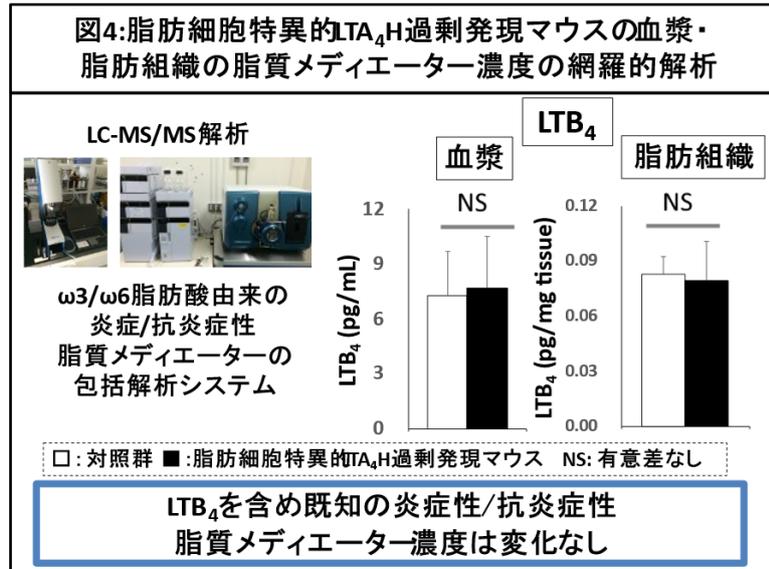
我々は、はじめにLTA₄H過剰発現によって脂肪組織の健康的増大が生じる機序について探索した。LTA₄HはLTB₄産生作用に加えて、トリペプチドProline-Glycine-Proline (PGP)の分解作用を持つことが報告されている。LTB₄・PGPはいずれも免疫細胞の浸潤に関わることが知られており、我々は、A-LTA₄HOEマウスの脂肪組織の健康的増大の機序として、脂肪組織への免疫細胞浸潤の変化に関わる可能性を考えた。そこで、血漿パラメーターや臓器重量の差がまだ生じていない、高脂肪食投与4週間後のA-LTA₄HOEマウ



スと対照マウスについて、精巣周囲白色脂肪組織(eWAT)中の免疫細胞数および関連マーカー遺伝子発現量を評価した。すると、A-LTA₄HOE マウスの eWAT 中の M2 マクロファージ数は対照と比し有意に増加し、M1 マクロファージ数/ M2 マクロファージ数の比は有意に低下した。また、A-LTA₄HOE マウスの eWAT において、Arg1 や Il10、Ym1 といった M2 マクロファージ関連マーカー遺伝子の発現が有意に増加した。その一方で、好中球、B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞などの免疫細胞数および関連マーカー遺伝子の発現は両群で有意差がなかった(図 3)。マクロファージ極性変化は既報でも脂肪組織の健康的増大に関わることが報告されており、本マウスの表現型の少なくとも一部が、脂肪組織の M2 マクロファージの増加によって生じている可能性が示唆された。次に我々は、A-LTA₄HOE マウスの脂肪組織において、LTB₄を含めた各種脂質メディエーター産生量を評価した。

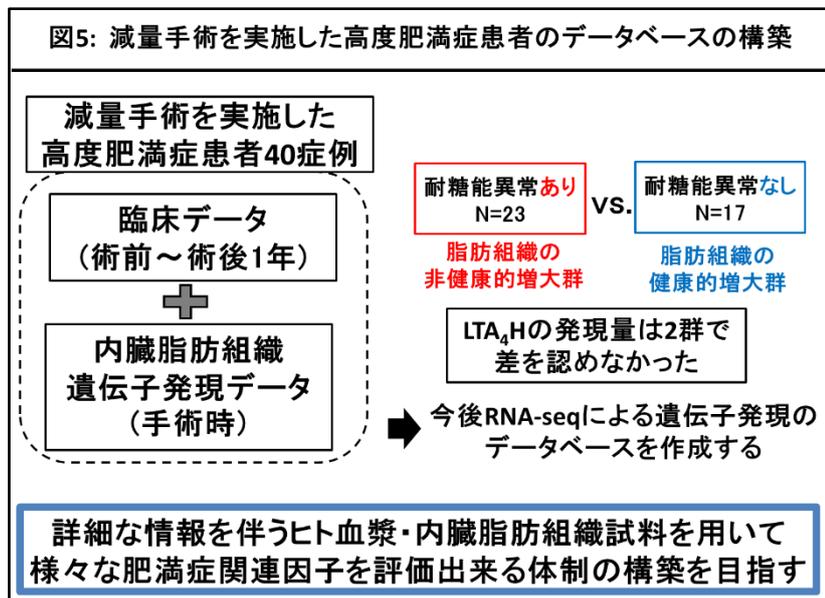
具体的には、LC-MS/MS を用いた包括的脂質メディエーター解析法を用いて、脂肪組織中の 60 種類以上の脂質メディエーター濃度を網羅的に測定した。しかし、4 週間および 16 週間の高脂肪食投与下いずれにおいても、LTB₄を含む既知の脂質メディエーター濃度に有意な変化は認められなかった(図 4)。LTA₄H のもう 1 つの標的分子である PGP については国内で濃度測定が可能な施設を見つけれ

られなかったため、本学において質量分析を用いた測定系の確立を目指し、達成した。今後、A-LTA₄HOE マウスおよび肥満ヒトの試料を用いて PGP 濃度の測定を行い、濃度の変化がある場合は、PGP について更なる解析を行う



実験計画 2. 高度肥満症患者の内臓脂肪組織及び血漿試料における代謝表現型の解析

減量外科治療を受ける高度肥満症患者の手術時に内臓脂肪組織を採取し、さらに術前および術後 1 年間に亘り経時的に血漿試料の採取を行い、40 症例の試料収集を完遂した。この 40 症例について、代謝異常を伴う「非健康的脂肪組織増大群」と代謝異常を伴わない「健康的脂肪組織増大群」に分類し、脂肪組織の Lta4h 遺伝子発現量を比較したところ、2 群間で有意な変化はなかった。また、脂肪組織中 Lta4h 遺伝子発現とイン



スリン感受性に関わる各種パラメーター(空腹時血糖、HbA1c、HOMA-R)の相関を40症例で評価したが、こちらにも有意な相関性は認められず、脂肪組織でのLTA₄H産生変化が、肥満病態におけるインスリン抵抗性の形成に生理的に関与する可能性は低いと考えられた。今後、脂肪組織・血漿中のPGP濃度を評価しつつ、同時に脂肪組織RNA-seqを実施し、肥満ヒトのデータベースの確立を目指す(図5)。

4 生活や産業への貢献および波及効果

現時点で、脂肪組織の健康的増大のメカニズムは明らかになっておらず、その点においての貢献・波及効果は今後の研究の進展に依るものといえる。一方で、PGPというトリペプチドは、呼吸器疾患や肝疾患、腸管における作用など全身での作用が近年報告されており、本研究の一環としてPGPの測定系を確立したことは、様々な疾患および生理機構の機序の解明の一助となる可能性がある。また、詳細な情報を伴うヒト血漿・内臓脂肪組織試料を用いて新規データベースを作成することは、今後様々な肥満症関連因子を評価できる体制の構築につながる。本研究でその基盤が確立されたことも大きいと考えられる。今後本データベースの完成に伴い、脂肪組織の健康的増大だけでなく、肥満症治療に関わる様々な研究の発展が期待される。この点は兵庫県の医療産業への貢献につながっているといえる。