

氏名 いがらし よしこ
五十嵐 喜子

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 213 号

学位授与年月日 平成 28 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Adipose tissue resident macrophages control induction
beige adipocytes under cold stimulation
(脂肪組織常在性マクロファージは寒冷刺激下における
ベージュ脂肪細胞の誘導を制御している)

論文審査委員

| | | | |
|--------|----|----|-----|
| (主査) | 教授 | 將積 | 日出夫 |
| (副査) | 教授 | 山本 | 善裕 |
| (副査) | 教授 | 稲寺 | 秀邦 |
| (副査) | 教授 | 清水 | 忠道 |
| (指導教員) | 教授 | 戸邊 | 一之 |

論文内容の要旨

[目的]

生活習慣の変化(運動不足・高脂肪食)にともない肥満・メタボリック症候群や 2 型糖尿病の患者が急増しその対策は急務である。脂肪組織には大きく分けて、過剰なエネルギーを中性脂肪として蓄積する白色脂肪組織と熱産生を行い体温を保つ褐色脂肪組織の 2 種類がある。褐色脂肪組織の機能は肥満や糖尿病のリスクと負に相関することが報告されている。近年、白色脂肪組織に存在し常温では白色脂肪細胞であるが個体に寒冷刺激等を加えることで褐色化し熱産生を行うベージュ細胞の存在が注目されている。したがって、白色脂肪組織のベージュ化のメカニズムを解明することは肥満の治療や予防につながると期待されている。白色脂肪組織には多くのマクロファージ、特に抗炎症性サイトカインを発現する M2 マクロファージが存在する。これまでにいくつかのグループが M2 マクロファージと皮下白色脂肪組織のベージュ化との関与を報告している。しかしながら、M2 マクロファージがベージュ化を調節する仕組みは十分には解明されていない。本研究では、M2 マクロファージをジフテリア毒素(DT)の投与により一過性に除去可能な CD206DTR マウスを用いて、白色脂肪組織のベージュ化における M2 マクロファージの役割を検討した。

[方法並びに成績]

[方法]

1. C57Black/6J マウスを室温(24℃)と寒冷(6℃)群に分けて、48 時間・72 時間・96 時間飼育を行い、褐色脂肪組織および鼠径部白色脂肪組織の変化を組織重量、免疫染色、遺伝子発現量から解析を行い、寒冷刺激がもたらすベージュ化への影響を検討した。

2. 次に、寒冷刺激による白色脂肪組織のベージュ化に M2 マクロファージがどのように関与するのかを Cd206DTR マウスを用いて検討した。予め野生型マウスと CD206DTR マウスに DT 毒素を 2 回投与し CD206DTR マウスの M2 マクロファージを一過性に除去した後、96 時間寒冷刺激(6℃)を行った。鼠径部白色脂肪組織の変化を、組織重量、免疫染色、遺伝子発現量から解析し、ベージュ化における M2 マクロファージの役割を検討した。

[結果]

1. C57Black/6J マウスへの寒冷刺激実験の結果、寒冷刺激群のマウス体重は48時間で一時減少する ($p<0.01$) が、その後体重は回復傾向を示した。また、96 時間の寒冷刺激の後、鼠径部白色脂肪組織の色に褐色化(ベージュ化)が認められた。免疫染色の結果、褐色脂肪細胞の特異的なマーカーである UCP1 の増加が確認された。また鼠径部脂肪組織の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した結果、UCP1 や PGC1 α などの褐色脂肪組織特異的なマーカーの増加が確認された ($p<0.01$)。
2. CD206DTR マウスに DT を投与すると寒冷刺激下においても野生型に比べて鼠径部白色脂肪組織では約 50% 程度の M2 マクロファージが除去され、鼠径部白色脂肪組織における脂肪サイズの低下が認められた。また、野生型と CD206DTR マウスともに寒冷刺激群で摂餌量は有意に増加した ($p<0.05$) が、体重に有意な差は見られなかった。寒冷刺激の後、遺伝子発現を解析した結果、CD206DTR マウスにおいて UCP1 や PGC1 α などのベージュ化に関する遺伝子発現の増加が見られ ($p<0.05$)、免疫染色においても UCP1 の増加が確認された。細胞増殖に関する遺伝子発現を確認した結果、Ki67 と Cyclin B1 の有意な増加がみられ ($p<0.05$)、免疫染色においても Ki67 の増加が確認できた。脂肪細胞の前駆細胞のマーカーである PDGFR α と Sca1 の遺伝子発現も有意な増加がみられ ($p<0.05$) Flow cytometry においても確認された。さらに、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞マーカーである CD137 と TMEM26 の遺伝子発現の有意な増加が確認された ($p<0.05$)。

[総括]

本研究では、まず C57Black/6J マウスを使用した実験で、寒冷刺激により鼠径部白色脂肪組織でベージュ脂肪細胞への分化が誘導されることを確認した。また、寒冷刺激下では M2 マクロファージの一過性の除去に伴い、ベージュ脂肪細胞とともに前駆細胞も増加していた。以上より M2 マクロファージはベージュ脂肪細胞の分化を抑制しており、M2 マクロファージの一過性の除去によりそれが解除された可能性が考えられた。これまで M2 マクロファージは IL-10 などの抗炎症性サイトカインを分泌し、炎症性 M1 マクロファージに拮抗して個体をインスリン感受性へと誘導するマクロファージと考えられていた。本研究では M2 マクロファージがベージュ脂肪細胞の前駆細胞のニッチを形成し増殖を抑制するとともに、ベージュ脂肪細胞への分化を抑制するという役割を司っていることが示唆された。本知見を発展させれば、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞及びその分化を人為的にコントロールすることで個体の熱産生や代謝亢進を誘導し、肥満やインスリン感受性の改善へと導く治療の開発に繋がる可能性がある。以上より、M2 マクロファージの一過性の除去は、肥満の治療や予防に有効な手段となることが期待される。

学位論文審査の要旨

【目的】

脂肪細胞は過剰なエネルギーを中性脂肪として蓄積する白色脂肪細胞と熱産生を行って体温を保つ褐色脂肪細胞の2種類がある。近年、本来は白色脂肪細胞であるが、個体に特定の刺激を与えることで褐色（ベージュ）化して熱産生の亢進に関与するベージュ脂肪細胞の存在が明らかとなり、白色脂肪細胞のベージュ化のメカニズムの解明は肥満の治療や予防につながるものとして期待されている。これまでの研究で、白色脂肪細胞に存在するM2マクロファージがベージュ化に関与することが報告されてきた。本研究では、M2マクロファージをジフテリア毒素（DT）投与により除去可能なCD206DTRマウスを用いて、白色脂肪細胞のベージュ化に対するM2マクロファージの役割を検討した。

【方法】

- (1) 野生型 (WT) マウス (C57Black/6Jマウス) を用いて、室温群と寒冷刺激群の2群に分け、48時間、72時間、96時間飼育を行い、摂餌量、体重、褐色脂肪細胞組織 (iBAT) および鼠腎部白色脂肪細胞組織 (ingWAT) の変化 (組織重量、免疫染色、遺伝子発現量から解析を行い、寒冷刺激がベージュ化に及ぼす影響を検討した。
- (2) WTマウスとCD206DTRマウスを用いて、両者にDT毒素を2回投与、後者でM2マクロファージを一過性に除去した後に、寒冷刺激下に96時間飼育を行い、摂餌量、体重、iBATおよびingWATの変化 (組織重量、免疫染色、遺伝子発現量) を解析、ベージュ化におけるM2マクロファージの役割を検討した。

【結果】

- (1) WT マウスへの寒冷刺激実験では、摂餌量は寒冷刺激群では常温群に比較して優位に増加するが、体重増加は見られなかった。96時間の寒冷刺激でingWATの褐色化 (ベージュ化) が認められた。ingWATでは、免疫染色によりベージュ化に特異的なマーカーであるUCP1が増加し、遺伝子解析によりベージュ化特異的遺伝子 (UCP1 や PGC1 α) の発現量増加が認められた。
- (2) CD206DTR マウスの実験では、CD206DTR マウスに DT を投与すると WT マウスに比べてingWATで50%のM2マクロファージが除去され、ingWATの脂肪サイズの低下が見られた。さらに、WTマウスに比べて、免疫染色によりingWAT組織のUCP1および細胞増殖マーカー (Ki67) の増加が見られた。遺伝子解析によりベージュ化特異的遺伝子 (UCP1 や PGC1 α)、脂肪細胞の前駆細胞マーカー遺伝子 (PDGFR α 、Sca1) およびベージュ脂肪細胞前駆細胞マーカー遺伝子 (TMEM26、CD137) の発現量増加が見とめられた。

【総括】

本研究により、五十嵐喜子君は、WTマウスにおいて寒冷刺激によりingWATでのベージュ化

に特異的なマーカー（UCP1）やベージュ化特異的遺伝子の発現量の増加を観察して、寒冷刺激下で白色脂肪細胞からベージュ脂肪細胞への分化が誘導されることを確認した。さらに、M2マクロファージを一過性に除去したマウス（CD206DTRマウス）への寒冷刺激実験により、WTマウスに比べてベージュ脂肪細胞前駆細胞マーカー遺伝子およびベージュ化特異的遺伝子の発現量が増加することを観察して、M2マクロファージの除去がベージュ脂肪細胞およびその前駆細胞を増加させることを確認した。以上より、M2マクロファージは、白色脂肪細胞のベージュ化に関して、前駆細胞の増殖を抑制するとともにベージュ脂肪細胞への分化を抑制する役割を担っていることが示唆された。白色脂肪細胞のベージュ脂肪細胞への誘導は個体の熱産生や代謝亢進につながり、肥満の改善へと導く可能性がある。このことからM2マクロファージの一過性除去は、肥満の治療や予防に有効な手段となることが期待される。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した