

表 題 骨髄細胞特異的な HMG-CoA 還元酵素抑制による
インスリン抵抗性改善作用についての検討

論文の区分 博士課程

著 者 名 武井 暁一

担当指導教員氏名 石橋 俊 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
内分泌代謝疾患学
代謝疾患学

2019年1月10日申請の学位論文

目次

1. 背景と目的	3
2. 方法	4
2-1. 実験動物	4
2-2. 血中パラメータの測定	4
2-3. 肝臓と腓腹筋のトリグリセリド含量の測定	4
2-4. 体組成の測定	5
2-5. 糖負荷試験およびインスリン負荷試験	5
2-6. タンパク質抽出およびイムノブロット法	5
2-7. 組織化学的染色および免疫蛍光染色	6
2-8. 間質血管細胞群の採取と磁気細胞分離	7
2-9. 走化性の測定	7
2-10. RNA の抽出および定量的リアルタイム PCR	8
2-11. 統計学的解析	10
3. 結果	11
3-1. <i>Hmgcr^{m/m}</i> マウスの表現型の解析	11
3-1-1. 体重および組織重量の評価	11
3-1-2. 体組成の評価	12
3-1-3. 摂餌量の評価	12
3-1-4. 血中脂質の評価	13
3-2. 耐糖能およびインスリン抵抗性の解析	14
3-2-1. NCD 条件下の耐糖能およびインスリン抵抗性の評価	14
3-2-2. HFD 条件下の耐糖能とインスリン抵抗性の評価	15
3-2-3. 組織におけるインスリンシグナルの評価	16
3-3. 脂肪組織における表現型の解析	18
3-3-1. ATMs 集積および平均脂肪細胞面積の評価	18
3-3-2. 精巣上体脂肪組織におけるマクロファージと炎症に関わる遺伝子発現の評価	19
3-3-3. 精巣上体脂肪組織におけるアディポネクチンの遺伝子発現の評価	20
3-3-4. 血漿中の TNF- α の評価	21
3-4. ATMs における表現型の解析	22
3-4-1. ATMs の炎症性遺伝子発現の評価	22
3-4-2. ATMs における局所増殖およびアポトーシスの評価	23
3-5. 肝臓における表現型の解析	25
3-5-1. 肝臓における脂肪沈着の評価	25
3-5-2. 肝臓の脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現の評価	25

3-5-3.	肝臓のマクロファージ数の評価	26
3-5-4.	肝臓におけるマクロファージと炎症に関わる遺伝子発現の評価	27
3-6.	骨格筋における表現型の解析	28
3-6-1.	腓腹筋における脂肪沈着の評価	28
3-6-2.	腓腹筋におけるマクロファージと炎症に関わる遺伝子発現の評価	28
3-7.	マクロファージの MCP-1 に対する走化性の解析	30
4.	考察	32
5.	結語	35
6.	謝辞	36
7.	引用文献	37

1. 背景と目的

肥満においては、脂肪組織マクロファージ (adipose tissue macrophages : ATMs) が集積し、慢性炎症が惹起される結果、インスリン抵抗性や 2 型糖尿病の発症リスクが増大する (1)。肥満のヒトおよびマウスの脂肪組織では、ATMs は構成細胞の 40%以上を占めるほどになる (2)。ATMs は非肥満では抗炎症性の状態 (M2) であるが、肥満では炎症性の状態 (M1) が優位となり、増加した M1 マクロファージは炎症性サイトカインを産生し、脂肪組織の炎症を悪化させインスリン抵抗性の形成に関与する (3)。一方で、CD11c⁺ 細胞を遺伝学的に除去すること (4) や Netrin-1 によるマクロファージ保持シグナルを遮断すること (5)、さらにクロドロネートリポソームを注射してマクロファージを除去すること (6, 7) のように ATMs の集積を抑制すると、脂肪組織の炎症およびインスリン抵抗性が改善することが報告されている。さらにヒトにおいても、ピオグリタゾンによる治療はインスリン抵抗性の改善を伴って ATM 集積を減少させることが報告されている (8, 9)。これらの研究結果は、ATM の集積を制御することはインスリン抵抗性を改善させる有望な戦略の一つであることを示唆している。

HMG-CoA 還元酵素 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase : HMGCR) はコレステロール合成を行うメバロン酸経路の律速酵素であり、HMG-CoA からメバロン酸への変換を触媒する (10)。HMGCR の阻害剤であるスタチンは、主に血中コレステロール値を低下させることにより、冠動脈疾患などの動脈硬化性疾患の発症を防ぐために広く用いられている。スタチンの抗動脈硬化作用は血中コレステロール値の低下だけでなく、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、単球・マクロファージを含む免疫細胞に対する様々な作用にも起因することが報告されてきた (11)。最近我々は、骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を遺伝学的に除去したマウスではマクロファージの遊走能が低下しており、高コレステロール血症とした際に形成される動脈硬化病巣が抑制されることを報告した (12)。これらの報告に基づいて我々は、骨髄細胞の *Hmgcr* を遺伝的に除去すると肥満の脂肪組織へのマクロファージの動員が低下する結果、インスリン抵抗性が改善するのではないかと仮定した。

この仮定を検証するために、Cre-loxP システムを用いて遺伝学的に骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去した (*Hmgcr^{m/m}*) マウスとコントロール(*Hmgcr^{fl/fl}*) マウスを高脂肪食で飼育し、血漿中の糖代謝や脂肪組織、肝臓、骨格筋におけるインスリンシグナルや組織学的な解析をおこなった。*Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較すると *Hmgcr^{m/m}* マウスでは高脂肪食よって誘導されるインスリン抵抗性や ATMs の集積、脂肪肝が減弱していた。

2. 方法

2-1. 実験動物

すべての動物実験は自治医科大学動物実験規定に合致した方法で行った。*Hmgcr* 遺伝子の開始コドンの位置するエクソン 2 を含むエクソン 2、3、4 の上流および下流に loxP 配列を挿入した *Hmgcr^{fl/fl}* マウス (13) に、マクロファージを含む骨髄細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Lysozyme-Cre トランスジェニックマウス (14) を交配することにより *Hmgcr^{m/m}* マウスを作製した (12)。週齢および性別が一致する同腹仔の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスをコントロールとした。本研究におけるすべてのマウスは C57BL/6J マウスが遺伝的背景である。8 週齢の雄マウスに通常食 (normal chow diet : NCD) (12kcal% 脂肪含有量 ; 日本クレア) または高脂肪食 (high-fat diet : HFD) (60kcal% 脂肪含有量、ラード使用 ; Research Diets) で 24 週間飼育した。マウスは室温 25°C で 12 時間ごとの明期と暗期のサイクルの下、餌と水は自由摂取とした。空腹時は絶食開始 16 時間後の状態と定義した。

2-2. 血中パラメータの測定

空腹時血漿グルコース値はグルコース CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。インスリン値はマウスインスリン測定キット (森永生科学研究所) を用いて測定した。インスリン抵抗性の指標となる homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) は次の通り計算した。空腹時血漿グルコース値 (mg/dL) × 空腹時血漿インスリン値 (μIU/mL) / 405。

血漿総コレステロール値はデタミナー L TC II (協和メデックス株式会社)、トリグリセリド値は L タイプワコー TG・M (和光純薬工業株式会社)、遊離脂肪酸は NEFA C テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。血漿 tumor necrosis factor-α (TNF-α) は Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用いて測定した。

2-3. 肝臓と腓腹筋のトリグリセリド含量の測定

肝臓と腓腹筋のトリグリセリド含量は既報 (15) に従って、1 : 1 のイソプロピルアルコールとヘプタンで脂質を抽出し、溶媒を蒸発させた。得られた脂質を

99.5% (v/v) のエタノールに再懸濁し、トリグリセリド含量は L タイプワコー TG・M (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。

2-4. 体組成の測定

体組成はコンピュータ断層撮影 (computed tomography : CT) (Latheta LCT-200; 日立アロカメディカル社) を用いて行った。マウスをイソフルラン (和光純薬) で麻酔し、1 mm 間隔で剣状突起から腹腔の底部まで撮影した。

2-5. 糖負荷試験およびインスリン負荷試験

糖負荷試験は 16 時間絶食後に、マウスに経口ゾンデを用いて 2.0 g/kg のグルコース液を投与することで行った。インスリン負荷試験は 4 時間絶食後に、マウスに 0.75 IU/kg のインスリン (Novolin R, Novo Nordisk) を腹腔内投与することで行った。尾静脈より血液を採取し、血糖測定器フリースタイルキッセイ (ニプロ株式会社) を用いて血糖を測定した。

2-6. タンパク質抽出およびイムノブロット法

インスリンシグナルの実験に際しては、16時間絶食後のマウスに生理食塩水またはインスリン (0.75 IU/kg) を腹腔内投与し、10分後に肝臓、精巣上体脂肪組織、腓腹筋を採取し液体窒素で急速凍結した。採取した組織はバッファー (Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche) and phosphatase inhibitor cocktails (PhosSTOP, Roche)) 内で破碎し、氷上で60分静置した。その後、4°C、15000rpm で15分間遠心分離し上清を採取し、BCA protein Assays (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質の定量を行った。タンパク質サンプルにLaeminiサンプルバッファーと最終濃度が50mMとなるように調整したジチオスレイトールを添加し、95°C、5分間加熱した。SDS-PAGEにてタンパク質を分離し、メンブレンに転写後、ブロッキングワンおよびブロッキングワンP (ナカライテスク) を用いて1時間室温で攪拌した。リン酸化AktおよびAktに対しての1次抗体は Phospho-Akt (Ser473) Antibody (#9271, Cell Signaling Technology)、Akt Antibody (#9272, Cell Signaling Technology) をそれぞれ2000倍希釈してメン

ブレンに添加し、4℃、16時間攪拌した。メンブレンをTris Buffered Saline with 0.05% Tween 20 (TBS-T) で洗浄後、2000倍希釈したHRP 標識二次抗体 (#7074, Cell Signaling Technology) を添加し、室温、1時間攪拌した。TBS-Tで洗浄後、Amersham™ ECL Prime™ Western Blotting Detection Reagent (GEヘルスケア) を使用して化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 (GEヘルスケア) により検出した。

2-7. 組織化学的染色および免疫蛍光染色

採取した肝臓、精巣上体脂肪組織、腓腹筋は 10%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業株式会社) に浸透させ、パラフィンで包埋した。肝臓のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン (サクラファインテックジャパン社) で核染色、エオジン (サクラファインテックジャパン社) で細胞質染色を行い、非水溶性封入剤マウントクイック (コスモ・バイオ社) で封入し、光学顕微鏡 AX-80 (オリンパス社) にてデジタルイメージを取得した。免疫化学染色に関しては、切片を Proteinase K により賦活化し、1%過酸化水素/メタノールによる内在性ペルオキシダーゼのブロッキングを行い、スキムミルクにて非特異反応のブロッキングを行った。マクロファージを検出するために 100 倍希釈したモノクローナル Rat anti-F4/80 抗体 (Bio-Rad) を 4℃、16 時間で反応させた。ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス) を用いて反応させ、DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Sigma-Aldrich) で発色させた。ヘマトキシリン (サクラファインテックジャパン社) にて核染色を行い、光学顕微鏡 AX-80 にて観察した。肝臓の F4/80 陽性細胞は 200 倍率のランダムな 3 視野において計測し、その平均数とした。精巣上体脂肪組織の Crown-like structures (CLSs) は 200 倍率のランダムな 10 視野において計測し、その平均数とした。また精巣上体脂肪組織の平均脂肪細胞面積は 200 倍率のランダムな 3 視野において計測し、その平均数とした。

ホルマウント免疫蛍光染色に関しては、次のように行った。安楽死させたマウスの心臓から 1%に希釈したパラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光) を数分間、10 mL 灌流させた。採取した精巣上体脂肪組織をハサミで小片に細かく刻み、1%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で、室温、30 分間固定した。組織を 1%Triton X-100 (ナカライテスク) で透過処理し、次いで Blocking One (ナカライテスク) で 30 分間、室温でブロッキングした。そして組織を 100 倍希釈したモノクローナル Rat anti-F4 / 80 抗体 (Bio-Rad) および 100 倍希釈したモノクローナル Rabbit anti-Ki67 抗体 (abcam) と共に 4℃で 16 時間反応さ

せた。リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) で洗浄後、F4/80 の 1 次抗体に対して 200 倍希釈した Alexa Fluor 488 goat anti rat IgG (Thermo Fisher Scientific) 抗体を、また Ki67 の 1 次抗体に対して 200 倍希釈した Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) 抗体を室温で 1 時間反応させた。また In situ Apoptosis Detection Kit (タカラ) を使用して TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuracil triphosphate nick end labeling) 染色を行い、アポトーシスを検出した。組織は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride solution) (同仁化学研究所) を用いて核染色を行った。観察には共焦点レーザー走査型生物顕微鏡 FV1000 (オリンパス) を用いた。最初に DAPI フィルターで観察することにより自家蛍光を避け、F4/80 陽性 Ki67 陽性細胞数と F4/80 陽性 TUNEL 陽性細胞数を 400 倍率のランダムな 5 視野の平均として計測した。

2-8. 間質血管細胞群の採取と磁気細胞分離

採取した精巣上体脂肪組織を細かく刻んだ後に、2 mg/mL に調整した collagenase Type II (C6885, Sigma-Aldrich) で 37°C、30 分間攪拌した。100µm セルストレーナー (Falcon) で濾過後、4°C、500g、10 分間遠心分離を行った。脂肪細胞を含む浮遊分画は PBS で 2 回洗浄した。間質血管細胞群を含む沈殿分画は lysing buffer (BD Biosciences) で再懸濁し、室温、5 分間静置し赤血球を除去した。PBS で 2 回洗浄後、2 mmol/L EDTA と 0.5% BSA (bovin serum albumin) (和光) を含む PBS で再懸濁し、FcR blocking reagent (ミルテニーバイオテック) を 4°C、10 分間反応させた。その後、細胞を biotin-conjugated anti-F4/80 antibody (eBioscience) と氷上で 30 分間反応させた。さらに細胞を anti-biotin MicroBeads (ミルテニーバイオテック) で 4°C、10 分間反応させることで磁気標識し、MS カラム (ミルテニーバイオテック) により磁気細胞分離システム (ミルテニーバイオテック) を用いて F4/80 陽性細胞を分離した。

2-9. 走化性の測定

チオグリコレート誘導性マクロファージ (Thioglycolate-elicited macrophages : TGEMs) は既報 (12) を参考に行った。8~12 週齢の雄の *Hmgcr^{fl/fl}* マウス、*Hmgcr^{m/m}* マウスの腹腔内に 2mL の 5%(w/v)チオグリコレート (和光) を注射し、3 日後に PBS (ナカライテック) で腹腔内を洗浄し、腹

腔洗浄液を回収した。遠心分離して得た細胞塊を培養液 DMEM (Gibco) (含 10% fetal bovine serum, 100units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin) に播種し、37°C、5%CO₂ の条件下で 2 時間培養後に、非接着細胞を除去し、接着細胞 TGEMs として実験に用いた。TGEMs の走化性実験には既報 (12) を参考に変更を加えて行った。6.5 mm ポリカーボネート膜細胞培養インサート (5.0- μ m Pore, Coring, Inc.) の上層に培養液で 5 \times 10⁵ 個/mL に再懸濁した TGEMs を播種し、下層には培養液に 100 ng/mL MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (R&D Systems) を添加した。37°C、5%CO₂ の条件下で 16 時間培養後、下層に遊走した TGEMs を 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光) で固定し、DAPI を用いて核染色を行った。蛍光顕微鏡 IX71 (オリンパス) で観察し、200 倍率のランダムな 3 視野の細胞数の平均を計測した。また条件に従ってメバロン酸 (Sigma-Aldrich) やスクアレン (Sigma-Aldrich) を最終濃度が 1 mM となるように添加した。

2-10. RNA の抽出および定量的リアルタイム PCR

RNA は TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて抽出し、High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。StepOnePlus (Thermo Fisher) を用いて定量的リアルタイム PCR を施行した。GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を内部標準として使用した。使用した各プライマー、プローブの配列を表 1 に示す。

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマー・プローブ一覧

Gene	Forward	Reverse	Probe
<i>Gapdh</i>	GTGGAGTCATACTGGAAC ATGTAG	AATGGTGAAGTTCGGTGT G	TGCAAATGGCAGCCCTG GTG
<i>Srebp1c</i>	TGGATTGCACATTTGAAG ACATG	GGCCCGGGAAGTCACTG T	CAGCTCATCAACAACCA
<i>Pparγ</i>	TCTTAACTGCCGGATCCA CAA	GCCCAAACCTGATGGCA TT	TCGGTTTCAGAAGTGC
<i>Fas</i>	GCTGCGGAAACTTCAGG AAAT	AGAGACGTGTCACTCCTG GACTT	ACTCGGCTACTGACACG A
<i>Scd1</i>	TCCGGAATGAACGAGA GAAGGTGAAGA	AGATCTCCAGTTCTTACA CGACCAC	GACGGATGTCTTCTTCCA GGTG
<i>Dgat1</i>	TCCGCCTCTGGGCATTC	GAATCGGCCCAACAATCC A	CCATGATGGCTCAGGTC CCTACTGG
<i>Cpt1a</i>	GAACCCCAACATCCCCA AAC	TCCTGGCATTCTCCTGGA AT	CACCAGGCTACAGTGG
<i>Mtp</i>	GCTCCCTCAGCTGGTGG AT	CAGGATGGCTTCTAGCGA GTCT	ACCTCTGCTCAGACTC
<i>F4/80</i>	GGAAGTGGATGGCATAG ATGA	ATTCACTGTCTGCTCAAC CG	AGTCTGGGAATGGGAGCT AAGGTCA
<i>Cd11c</i>	CTACCCGAGCCATCAAT CAG	GCTCTGCTTTCTACTGAG TTCA	AGCCAGAACTTCCCAAC TGCACA
<i>Tnf-α</i>	AGGGATGAGAAGTTCCC AAATG	TGTGAGGGTCTGGGCCAT A	CCTCCCTCTCATCAGTT
<i>Il-1β</i>	CTCTTGTTGATGTGCTGCT G	GACCTGTTCTTTGAAGTT GACG	TTCCAAACCTTTGACCTG GGCTGT
<i>Il-6</i>	CAAGTGCATCATCGTTGT TCA	GATACCACTCCCAACAG ACC	CCATTGCACAACCTTTTT CTCATTTCACG
<i>Mcp-1</i>	AACTACAGTTCTTTGGGA CA	CATCCACGTGTTGGCTCA	ACTCACCTGCTGCTACTC ATTCACC
<i>Cd163</i>	ATCCGCCTTTGAATCCAT CTC	GTCCTCCTCATTGTCTTC CTC	AGTCGCTGAATCTGTCGT CGCTTC
<i>Adipoq</i>	GCAGGATTAAGAGGAAC AGGAG	TGTCTGTACGATTGTCAG TGG	ACGACACCAAAGGGCT CAGGAT
<i>Cd36</i> *	Mm01135198_ml		
<i>Acox1</i> *	Mm00443579_m1		
<i>CD68</i> *	Mm00839636_g1		
<i>Cd206</i> *	Mm00485148_m1		

* Applied Biosystems 社製品。

2-11. 統計学的解析

データはすべて平均値±標準偏差で示した。GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software) を用いて全ての解析を行った。2 群間での比較は Student's t 検定を行った。異なる要因による対応のある反復測定の場合の比較は two-way ANOVA の後、Bonferroni 法により検定を行った。P 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

3. 結果

3-1. *Hmgcr^{m/m}*マウスの表現型の解析

3-1-1. 体重および組織重量の評価

8週齢の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスおよび *Hmgcr^{m/m}* マウスをそれぞれ NCD または HFD で24週間飼育し解析した。NCD 条件下の体重は *Hmgcr^{m/m}* マウスで30%増加し、*Hmgcr^{fl/fl}* マウスでは31%増加した。HFD 条件下の体重は *Hmgcr^{m/m}* マウスで67%増加し、*Hmgcr^{fl/fl}* マウスでは72%増加した。NCD および HFD 条件下のいずれの時点でも2群間において有意差はなかった。また精巢上体脂肪組織と肝臓の重量はNCD および HFD 条件下のいずれの場合でも、2群間において有意差はなかった。(図1)。

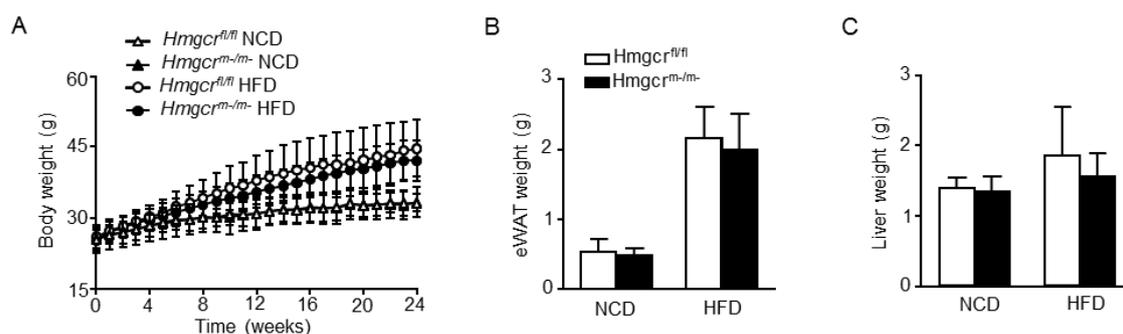


図1. 体重推移および組織重量

A: NCD (n=5-7) または HFD (n=13) 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの体重推移。

NCD 条件下の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスは白三角、HFD 条件下の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスは白丸で示した。NCD 条件下の *Hmgcr^{m/m}* マウスは黒三角、HFD 条件下の *Hmgcr^{m/m}* マウスは黒丸で示した。

B-C: NCD (n=8) または HFD (n=9-10) 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの精巢上体脂肪組織重量 (B) および肝臓重量 (C)。

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフで示した。

3-1-2. 体組成の評価

HFD 条件下における体組成を調べると、皮下脂肪量、内臓脂肪量、除脂肪量のいずれも 2 群間で有意差はなかった (図 2)。

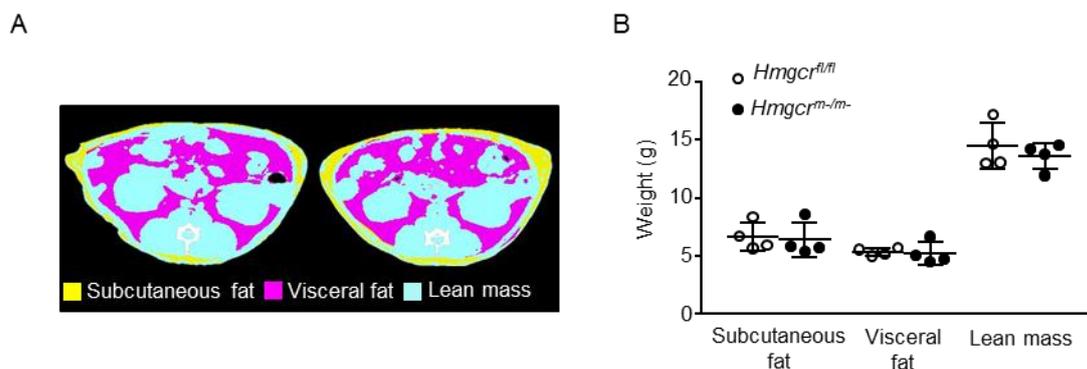


図 2. CT により測定した体組成

HFD 条件下の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスは白丸、HFD の *Hmgcr^{m/m}* マウスは黒丸で示した。

A-B: 代表的な CT 画像 (A)。黄色は皮下脂肪領域、ピンク色は内臓脂肪領域、青色は除脂肪領域を示す。皮下脂肪、内臓脂肪、除脂肪量を CT により定量化した (B) (n=4)。

3-1-3. 摂餌量の評価

摂餌量は NCD および HFD 条件下のいずれの場合でも、2 群間で有意差はなかった (図 3)。

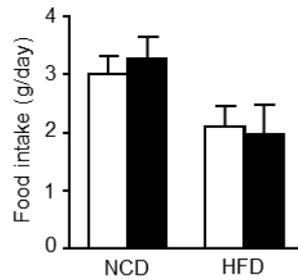


図 3. 摂餌量

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフで示した。NCD および HFD 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの摂餌量 (n=7-8)。

3-1-4. 血中脂質の評価

HFD 条件下における血漿中の脂質を調べると、総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸のいずれも 2 群間で有意差はなかった (図 4)。

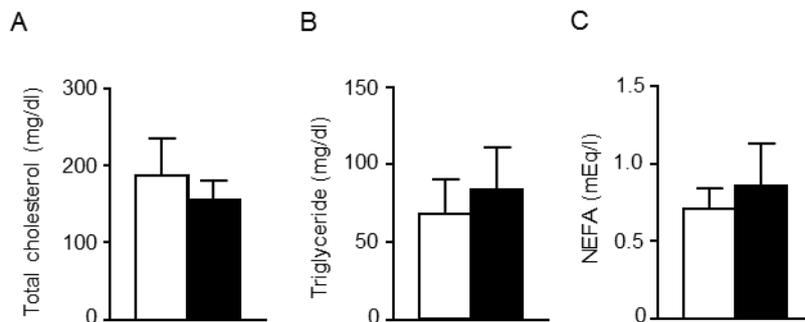


図 4. 血中脂質

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフで示した。A-C: HFD 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスおよび *Hmgcr^{m/m}* マウスの血漿総コレステロール (A)、トリグリセリド (B)、遊離脂肪酸 (C) (n=8)。

3-2. 耐糖能およびインスリン抵抗性の解析

3-2-1. NCD 条件下の耐糖能およびインスリン抵抗性の評価

NCD 条件下における空腹時血漿グルコース値、インスリン値、HOMA-IR は 2 群間で有意差はなかった。さらに糖負荷試験、インスリン負荷試験での血糖推移も 2 群間で有意差はなかった (図 5)。

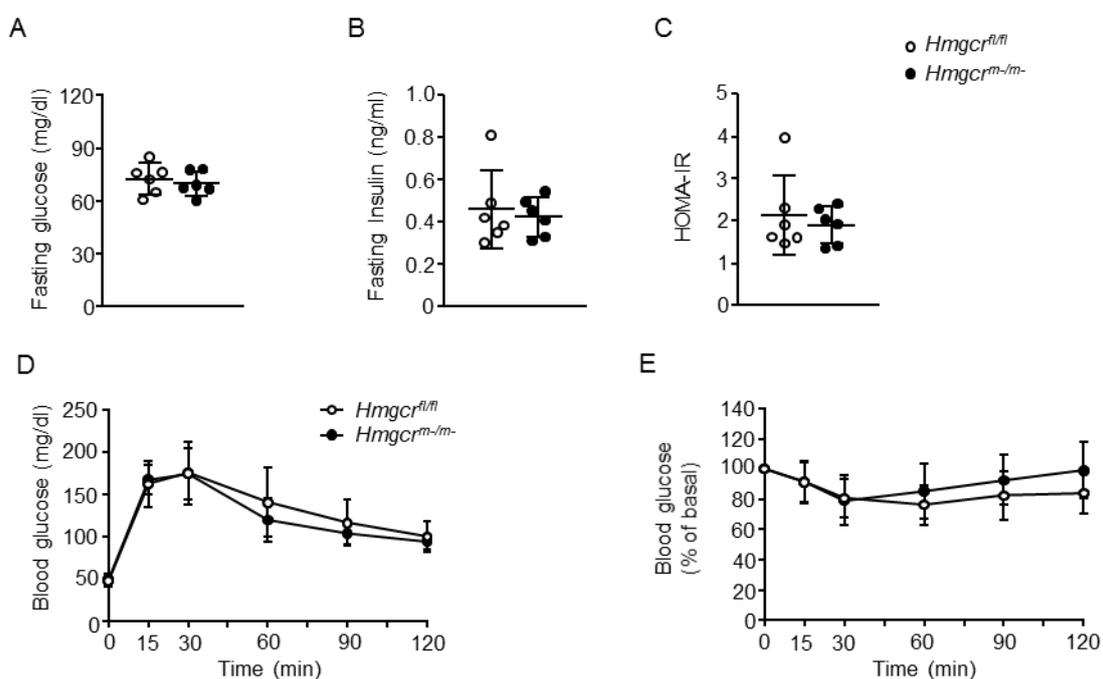


図 5. NCD 条件下の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの耐糖能およびインスリン抵抗性

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白丸、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒丸で示した。

A-C: NCD 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの空腹時血漿グルコース (A)、インスリン値 (B)、HOMA-IR (C) (n=6)。

D-E: NCD 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの糖負荷試験 (D)、インスリン負荷試験 (E) (n=10-11)。

3-2-2. HFD 条件下の耐糖能とインスリン抵抗性の評価

HFD 条件下における空腹時血漿グルコース値、インスリン値、HOMA-IR は *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較すると、*Hmgcr^{m/m}* マウスでいずれも有意に低下していた。さらに *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較すると *Hmgcr^{m/m}* マウスでは糖負荷試験で耐糖能の改善を示し、インスリン負荷試験ではインスリン感受性の改善を示した (図 6)。

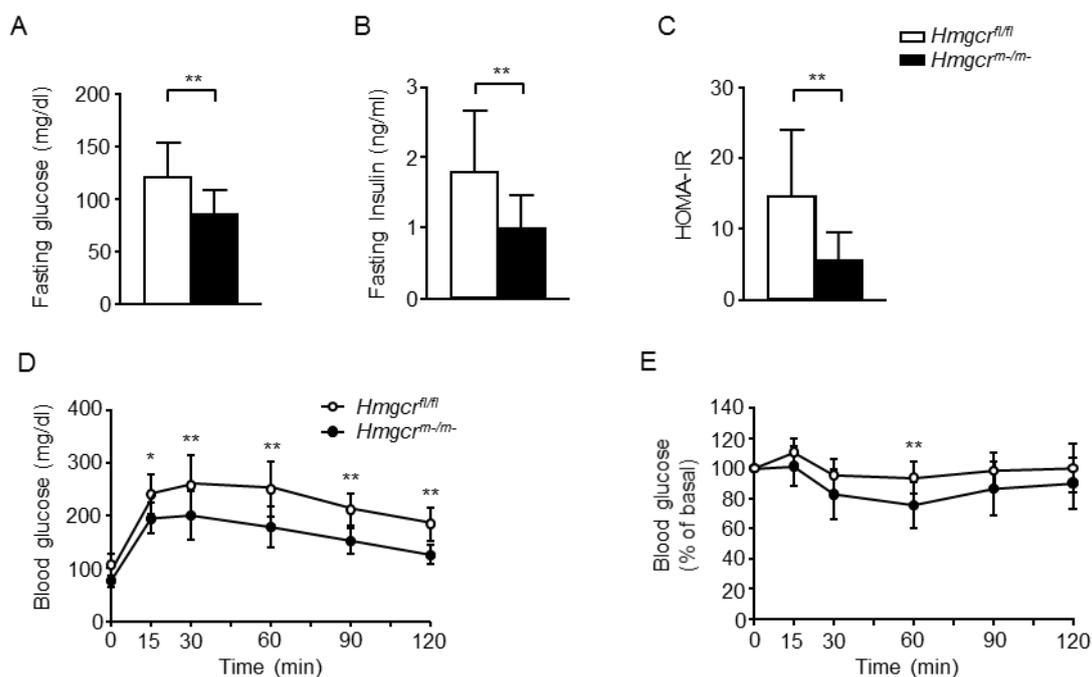


図 6. HFD 条件下の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの耐糖能およびインスリン抵抗性

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフまたは白丸、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフまたは黒丸で示した。

A-C: HFD 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの空腹時血漿グルコース (A)、インスリン値 (B)、HOMA-IR (C) (n=14-15)。

D-E: HFD 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの糖負荷試験 (D)、インスリン負荷試験 (E) (n=11-12)。

*P < 0.05, **P < 0.01。

3-2-3. 組織におけるインスリンシグナルの評価

組織におけるインスリン感受性の変化を調べるために、HFD 条件下のマウスの肝臓、精巣上体脂肪組織、腓腹筋においてインスリン刺激による Akt のリン酸化の変化をイムノブロット法で調べた (図 7)。インスリン刺激が無い場合と比較すると、インスリン刺激による Akt のリン酸化は肝臓において *Hmgcr^{m/m}* マウスでは 4.5 倍で *Hmgcr^{fl/fl}* マウスでは 2.9 倍、精巣上体脂肪組織において *Hmgcr^{m/m}* マウスでは 34.7 倍で *Hmgcr^{fl/fl}* マウスでは 10.7 倍、腓腹筋において *Hmgcr^{m/m}* マウスでは 8.5 倍で *Hmgcr^{fl/fl}* マウスでは 5.9 倍に有意に増加していた。そして *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較すると *Hmgcr^{m/m}* マウスでは、インスリン刺激による Akt のリン酸化の増加の割合は肝臓で 1.5 倍、精巣上体脂肪組織で 2 倍、腓腹筋で 3 倍に有意に増加していた。これらの結果から、骨髄細胞における *Hmgcr* の遺伝的除去は HFD によって誘導されるインスリン抵抗性を減弱することが示唆された。

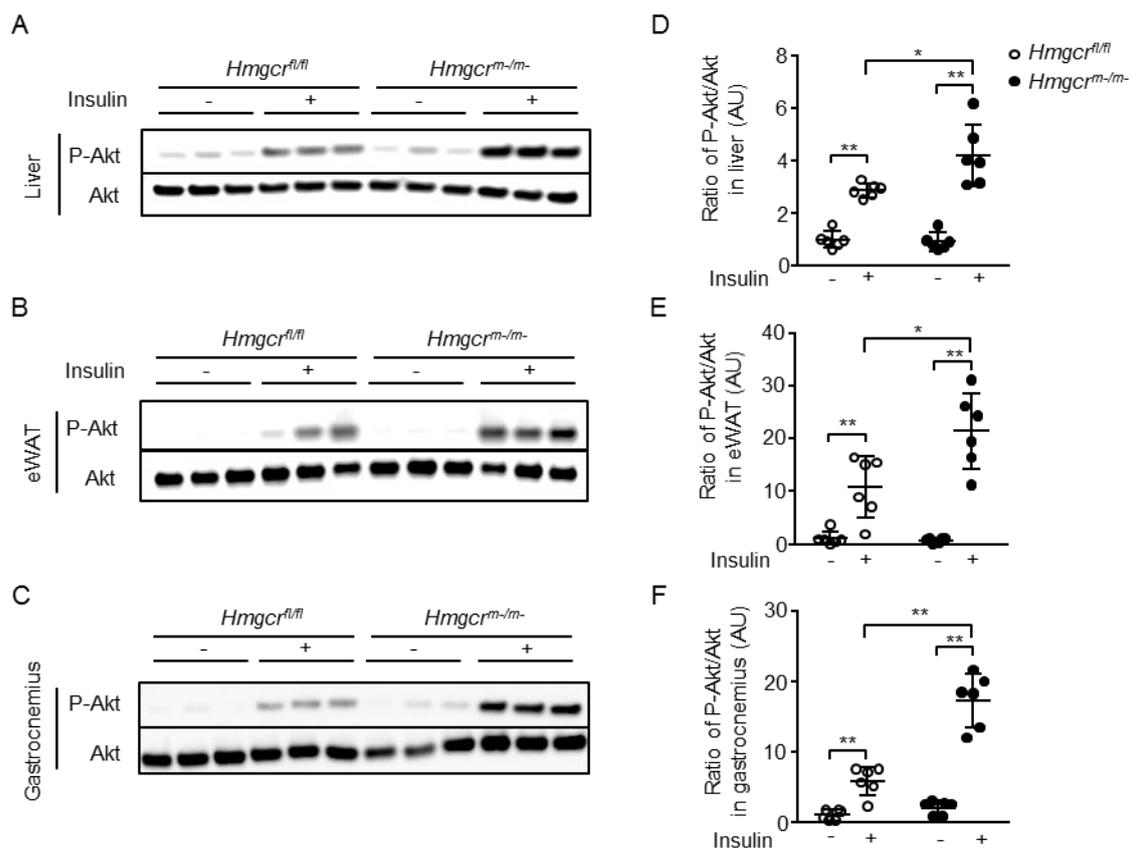


図 7.インスリン刺激後の組織におけるリン酸化 Akt と Akt の解析

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白丸、*Hmgcr^{m-/m-}* マウスは黒丸で示した。

A-C: HFD 条件下における *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m-/m-}* マウスのインスリン刺激後のリン酸化 Akt と Akt を肝臓 (A)、精巣上体脂肪組織 (B)、腓腹筋 (C) においてイムノブロット法により解析した。

D-E: 肝臓 (D)、精巣上体脂肪組織 (E)、腓腹筋 (F) における Akt に対するリン酸化 Akt の比を、各組織におけるインスリン刺激のない *Hmgcr^{fl/fl}* マウスを基準として定量化した (n=6)。

*P < 0.05, **P < 0.01。

3-3. 脂肪組織における表現型の解析

3-3-1. ATMs 集積および平均脂肪細胞面積の評価

肥満状態の ATMs は壊死した脂肪細胞を取り囲むように存在しており、その構造は **crown-like structures (CLSs)** として知られている (16)。骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去した場合に、ATMs の集積がどう変化するかを調べるために精巣上体脂肪組織の切片において F4/80 免疫染色を行った (図 8)。HFD 条件下において *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較すると *Hmgcr^{m/m}* マウスで F4/80 陽性 CLSs 数は 77% 低下していた。また HFD 条件下における平均脂肪細胞面積は、*Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較すると *Hmgcr^{m/m}* マウスで 12% 有意に低下していた。

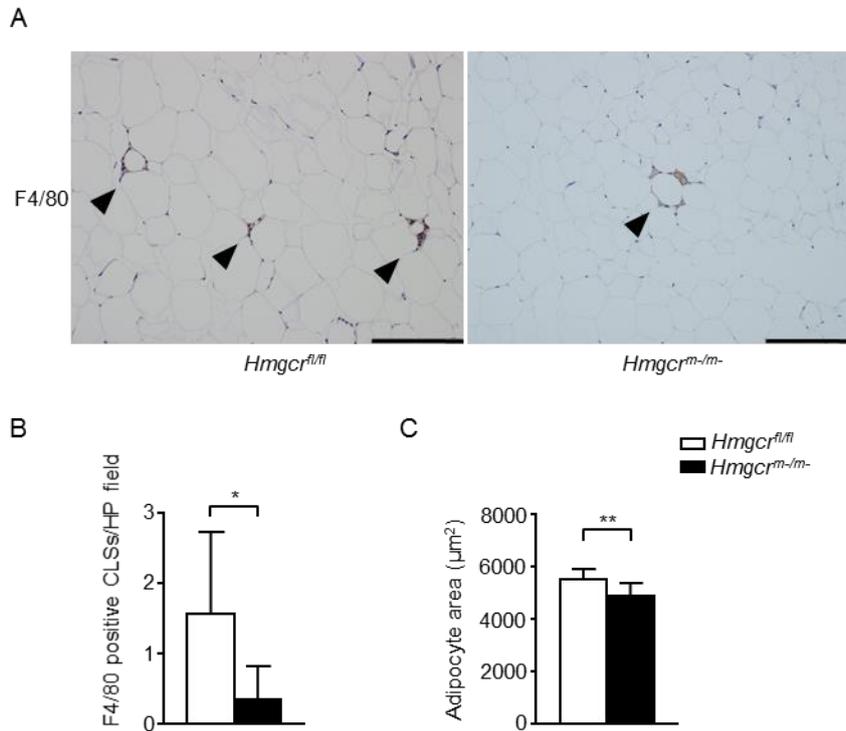


図 8. HFD 条件下の精巣上体脂肪組織の F4/80 免疫染色と平均脂肪細胞面積
Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m-/m-}* マウスは黒の棒グラフで示した。
 A: *Hmgcr^{fl/fl}* マウス (左) と *Hmgcr^{m-/m-}* マウス (右) の精巣上体脂肪組織の F4/80 免疫染色像。スケールバーは 200 μm 。
 B: *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m-/m-}* マウスの精巣上体脂肪組織における F4/80 陽性 CLSs 数はランダムな 10 視野で計測し、その平均数とした (n=8)。
 C: *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m-/m-}* マウスの精巣上体脂肪組織の平均脂肪細胞面積はランダムな 3 視野で計測し、その平均数とした (n=8)。
 *P < 0.05, **P < 0.01。

3-3-2. 精巣上体脂肪組織におけるマクロファージと炎症に関わる遺伝子発現の評価

さらに精巣上体脂肪組織においてマクロファージおよび炎症に関わる遺伝子の発現を調べた (図 9)。CLSs 数の低下と一致して、マクロファージ全般のマーカーである *F4/80* や *Cd68*、炎症性の M1 マーカーである *Cd11c* や *Tnf- α* 、interleukin-1 β (*Il-1 β*)、*Mcp-1* といった遺伝子の mRNA 発現レベルは、HFD 条件下において *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m-/m-}* マウスで有意に低下していた。interleukin-6 (*Il-6*) の mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。一

方で抗炎症性の M2 マーカーである *Cd206* や *Cd163* といった遺伝子の mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。

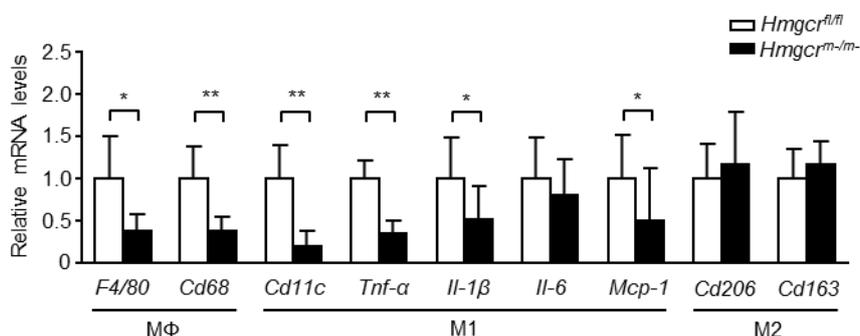


図 9. HFD 条件下の精巣上体脂肪組織におけるマクロファージ全般のマーカー (MΦ) と M1 マーカー (M1)、M2 マーカー (M2) 遺伝子の mRNA 発現レベル *Hmgcr^{fl/fl}* マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m-/m-}* マウスは黒の棒グラフで示した (n=7-8)。

*P < 0.05, **P < 0.01。

3-3-3. 精巣上体脂肪組織におけるアディポネクチンの遺伝子発現の評価

アディポネクチンは脂肪細胞に由来するインスリン感受性を改善するホルモンである (17, 18)。そこで精巣上体脂肪組織におけるアディポネクチンの mRNA 発現レベルを測定すると、HFD 条件下において *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m-/m-}* マウスで有意に増加していた(図 10)。

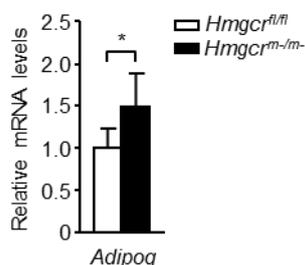


図 10. HFD 条件下の精巣上体脂肪組織におけるアディポネクチンの mRNA 発現レベル

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m-/m-}* マウスは黒の棒グラフで示した (n=8)。

*P < 0.05

3-3-4. 血漿中の TNF- α の評価

TNF- α はインスリン作用に拮抗することが知られている (19)。そこで血漿中の TNF- α 濃度を測定した (図 11)。HFD 条件下の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスでは有意に低下していた。これらの結果から、骨髄細胞における *Hmgcr* の遺伝的除去は ATMs 集積を抑制し、脂肪組織の炎症を減弱することが示唆された。

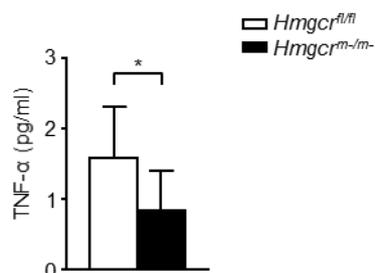


図 11. HFD 条件下の血漿における TNF- α 濃度

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフで示した (n=10)。

*P < 0.05

3-4. ATMs における表現型の解析

3-4-1. ATMs の炎症性遺伝子発現の評価

ATMs の炎症性変化を調べるために、HFD 条件下における 2 群のマウスの精巣上体脂肪組織から MACS を用いて ATMs を単離し、F4/80 陽性細胞における炎症誘発性遺伝子の mRNA 発現レベルを調べた (図 12)。*Tnf- α* や *Il-1 β* 、*Il-6* といった M1 マーカーとなる遺伝子の mRNA 発現レベルは、HFD 条件下における 2 群間で有意差はなかった。*Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスの精巣上体脂肪組織における遺伝子発現では、マクロファージ全般および M1 マーカーが低下した一方で、M2 マーカーは 2 群間で差がなかった。このことから *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスの精巣上体脂肪組織から単離した F4/80 陽性細胞の M2 マーカーの遺伝子発現は増加していることが予想されたが、M2 マーカー遺伝子の *Cd163* の mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。周囲環境からの刺激により ATMs の細胞内代謝や機能は影響されることが報告されており (20)、精巣上体脂肪組織から単離する過程で ATMs の周囲環境が変化し、単離した状態での ATMs の遺伝子発現に影響を与えた可能性がある。また本研究では遺伝子発現レベルの解析であり、ATMs は M1 および M2 マーカーを共発現する場合もあることから、M1/M2 を明瞭に区別することは難しい。そのため骨髄細胞における *Hmgcr* の遺伝的除去による ATMs の M1/M2 バランスへの影響を調べるにはさらなる研究が必要である。

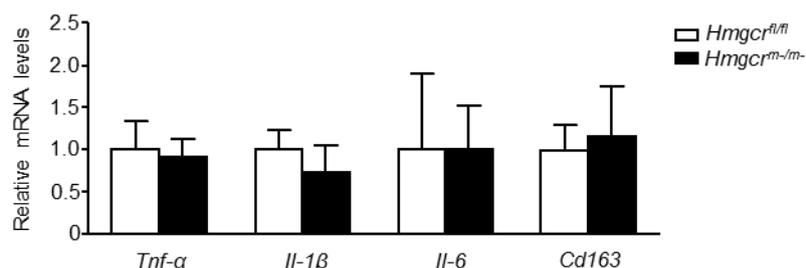


図 12. HFD 条件下のマウスの精巣上体脂肪組織から単離した F4/80 陽性細胞の mRNA 発現レベル

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフで示した (n=8)。

3-4-2. ATMs における局所増殖およびアポトーシスの評価

肥満においてマクロファージは脂肪組織へ動員されるが、脂肪組織局所での増殖やアポトーシスの低下によっても ATMs 数は増加することが報告されている (2, 21, 22)。ATMs における局所増殖とアポトーシスを評価するために、ホルマウント免疫蛍光染色を行い Ki67 陽性 ATMs と TUNEL 陽性 ATMs を検出した (図 13)。Ki67 陽性 ATMs の割合は HFD 条件下における 2 群間で有意差はなかった。また TUNEL 陽性 ATMs の割合も HFD 条件下における 2 群間で有意差はなかった。

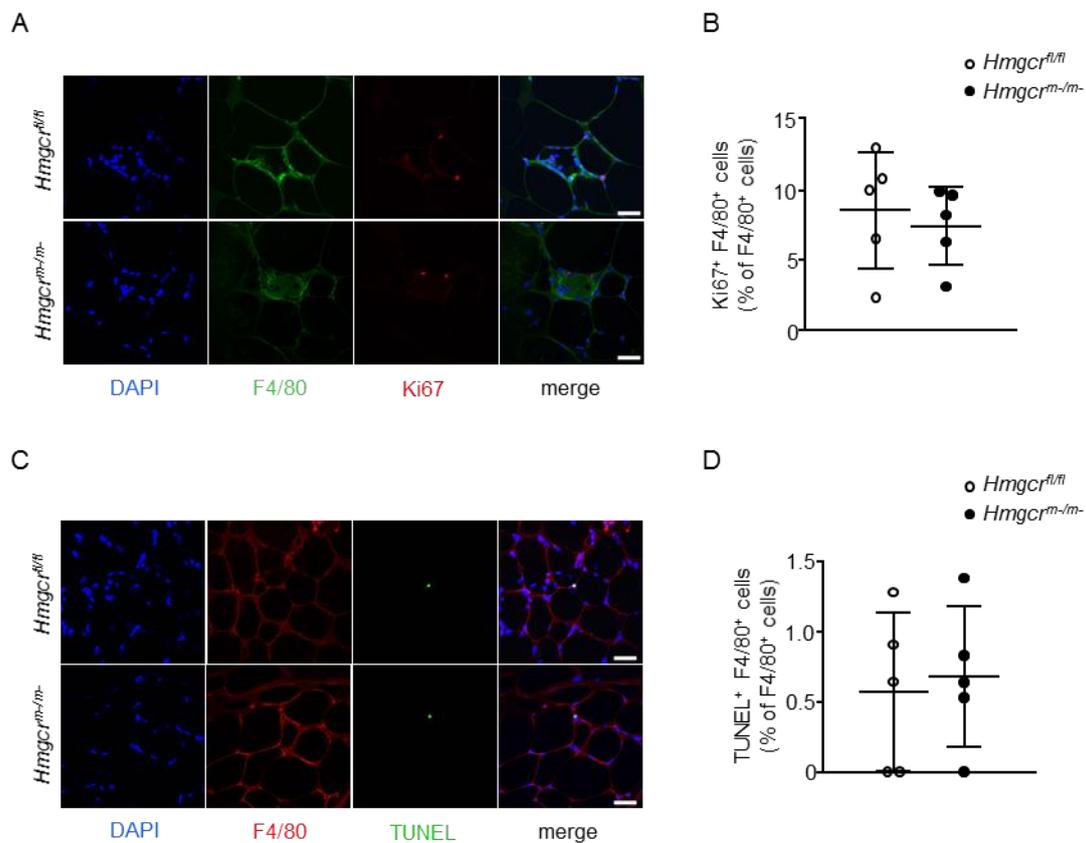


図 13. HFD 条件下のマウスの精巣上体脂肪組織におけるホールマウント免疫蛍光染色

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白丸、*Hmgcr^{m-/m-}* マウスは黒丸で示した。

A: HFD 条件下のマウスの精巣上体脂肪組織において、核は DAPI (青)、マクロファージは F4/80 (緑)、細胞増殖は Ki67 (赤) で示した代表的な免疫蛍光染色像。スケールバーは 50 μ m。

B: F4/80 陽性細胞における F4/80 陽性かつ Ki67 陽性細胞の割合は、ランダムな 5 視野で計測した割合の平均とした (n=5)。

C: HFD 条件下のマウスの精巣上体脂肪組織において、核は DAPI (青)、マクロファージは F4/80 (赤)、アポトーシスは TUNEL (緑) で示した代表的な免疫蛍光染色像。スケールバーは 50 μ m。

D: F4/80 陽性細胞における F4/80 陽性かつ TUNEL 陽性細胞の割合は、ランダムな 5 視野で計測した割合の平均とした (n=5)。

3-5. 肝臓における表現型の解析

3-5-1. 肝臓における脂肪沈着の評価

HFD 条件下における肝臓重量は 2 群間で有意差はなかったが (図 1. C)、肝臓の HE 染色を観察すると *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスでは脂肪沈着が減弱しており、また *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスの肝臓トリグリセリド含量は 52% 低下していた (図 14)。

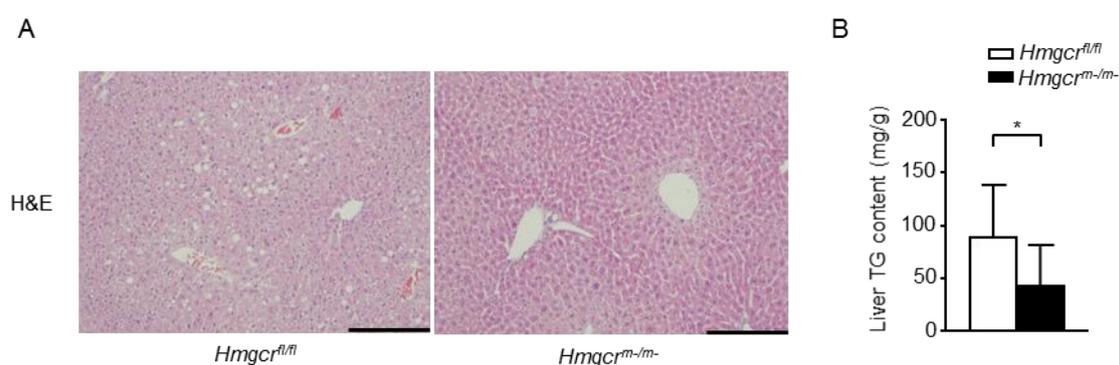


図 14. HFD 条件下における肝臓の組織像とトリグリセリド含量
Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフで示した。
A: *Hmgcr^{fl/fl}* マウス (左) と *Hmgcr^{m/m}* マウス (右) の肝臓の HE 染色像。スケールバーは 200 μ m。
B: *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの肝臓のトリグリセリド含量 (n=12)。
*P < 0.05。

3-5-2. 肝臓の脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現の評価

HFD 条件下において *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスの肝臓の脂肪沈着は軽減しており、その機序を調べるために脂肪酸代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現レベルを調べた (図 15)。脂質生成に関わる sterol regulatory element-binding protein-1c (*Srebp1c*) や fatty acid synthase (*Fas*)、stearoyl-Coenzyme A desaturase-1 (*Scd1*)、diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*Dgat1*) といった遺伝子の mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。また脂肪酸酸化に関わる carnitine palmitoyltransferase 1a (*Cpt1a*) や acyl-Coenzyme A oxidase 1 (*Acox1*) といった遺伝子、さらに very low-density lipoprotein (VLDL) の分泌に関わる microsomal triglyceride transfer protein (*Mtp*) の遺

伝子の mRNA 発現レベルも 2 群間で有意差はなかった。しかし脂肪酸の取り込みに関与する *Cd36* と *Cd36* の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- γ (*Ppar γ*) の遺伝子の mRNA 発現レベルは *Hmgcr^{f/f}* マウスと比較すると *Hmgcr^{m/m}* マウスで有意に低下していた。

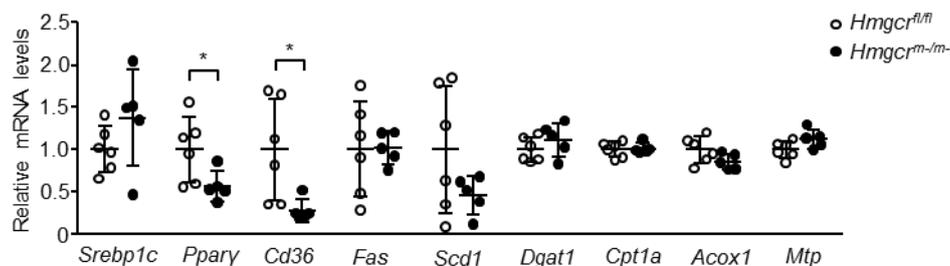


図 15. HFD 条件下での肝臓の脂肪酸代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現レベル *Hmgcr^{f/f}* マウスは白丸、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒丸で示した (n=5-6)。

*P < 0.05。

3-5-3. 肝臓のマクロファージ数の評価

肝臓のマクロファージの数を評価するために F4/80 免疫染色を行った (図 16)。F4/80 陽性マクロファージの数は HFD 条件下における 2 群間で有意差はなかった。

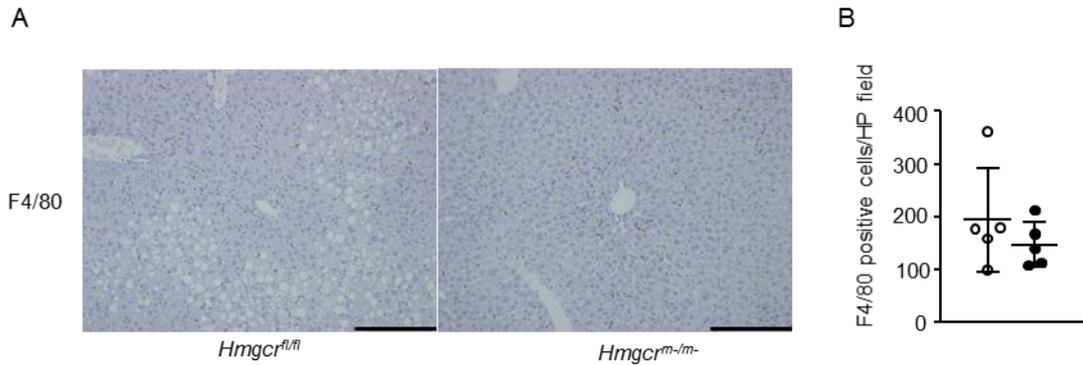


図 16. HFD 条件下における肝臓の F4/80 免疫染色
Hmgcr^{fl/fl} マウスは白丸、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒丸で示した。
 A: *Hmgcr^{fl/fl}* マウス (左) と *Hmgcr^{m/m}* マウス (右) の肝臓の F4/80 免疫染色像。
 スケールバーは 200 μ m。
 B: *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと *Hmgcr^{m/m}* マウスの肝臓の F4/80 陽性細胞数は 3 視野に
 において計測し、その平均数とした (n=5)。

3-5-4. 肝臓におけるマクロファージと炎症に関わる遺伝子発現の評価

肝臓の F4/80 免疫染色の解析結果と一致して、マクロファージ全般のマーカーである *F4/80* や *Cd68*、炎症性の M1 マーカーである *Cd11c* や *Tnf- α* 、*Il-1 β* 、*Il-6*、抗炎症性の M2 マーカーである *Cd206* といった遺伝子の mRNA 発現レベルは HFD 条件下における 2 群間で有意差はなかった (図 17)。

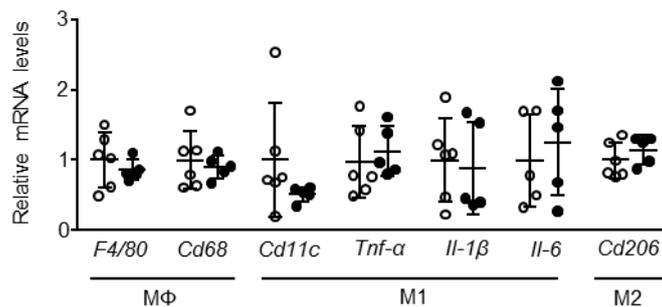


図 17. HFD 条件下の肝臓におけるマクロファージ全般のマーカー (M Φ) と M1
 マーカー (M1)、M2 マーカー (M2) の遺伝子の mRNA 発現レベル
Hmgcr^{fl/fl} マウスは白丸、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒丸で示した (n=5-6)。

3-6. 骨格筋における表現型の解析

3-6-1. 腓腹筋における脂肪沈着の評価

骨格筋への脂肪沈着を評価するために、腓腹筋のトリグリセリド含量を調べた (図 18)。HFD 条件下において *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスで腓腹筋のトリグリセリド含量は 18% 有意に低下していた。

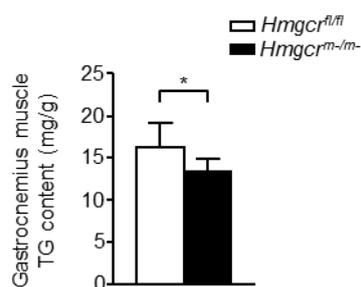


図 18. HFD 条件下の腓腹筋のトリグリセリド含量

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}* マウスは黒の棒グラフで示した (n=8-9)。

*P < 0.05。

3-6-2. 腓腹筋におけるマクロファージと炎症に関わる遺伝子発現の評価

腓腹筋におけるマクロファージと炎症に関連する遺伝子の mRNA 発現レベルを調べた (図 19)。HFD 条件下の腓腹筋においてマクロファージ全般のマーカーである *F4/80* や *Cd68*、炎症性の M1 マーカーである *Cd11c* や *Tnf- α* といった遺伝子の mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。

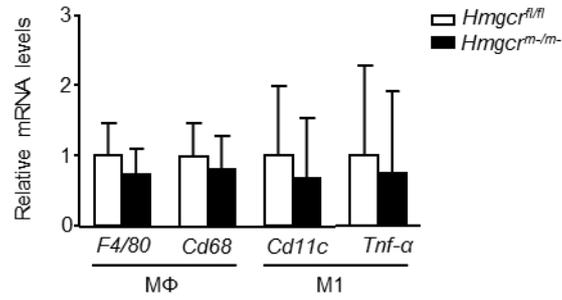


図 19. HFD 条件下の腓腹筋におけるマクロファージ全般のマーカ (MΦ) と M1 マーカ (M1) 遺伝子の mRNA 発現レベル *Hmgcr^{fl/fl}* マウスは白の棒グラフ、*Hmgcr^{m/m}*-マウスは黒の棒グラフで示した (n=8)。

3-7. マクロファージの MCP-1 に対する走化性の解析

MCP-1 は肥満のマウス (23) およびヒト (24) において過剰に産生されており、脂肪組織へのマクロファージの動員の一因となっている (25, 26)。*Hmgcr^{m/m}* マウスでは、マクロファージの遊走能が低下することを最近我々は見出した (12)。マクロファージにおける *Hmgcr* の遺伝的除去は、MCP-1 に対する走化性にどう影響するか調べるため、TGEMs を用いてその走化性を測定した (図 20)。予想通り、*Hmgcr^{fl/fl}* マウスから単離した TGEMs と比較して *Hmgcr^{m/m}* マウスから単離した TGEMs では、MCP-1 に対する走化性が 54% 低下していた。この MCP-1 に対する走化性の低下は、メバロン酸を添加することで回復したが、スクアレンの添加では回復しなかった。これらの結果から、マクロファージの走化性には、メバロン酸経路の中でステロール経路への分岐点であるスクアレンではなく、非ステロール経路から生成されるイソプレノイド類が重要な役割を果たすことが示唆された。

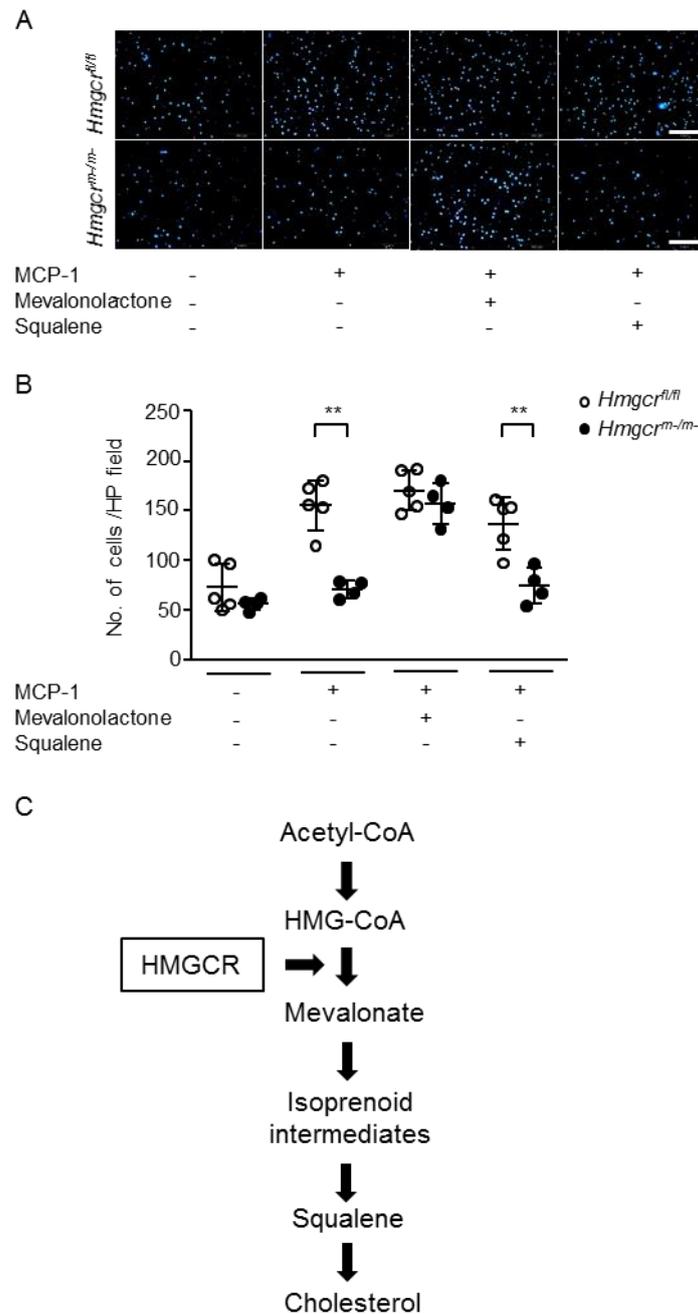


図 20. マクロファージの MCP-1 に対する走化性

Hmgcr^{fl/fl} マウスは白丸、*Hmgcr*^{m-/m} マウスは黒丸で示した。

A: TGEMs の MCP-1 に対する走化性を測定した代表的な像。核は DAPI (青) で示した。スケールバーは 200 μ m。

B: 遊走した TGEMs 数はランダムな 3 視野で計測し、その平均数とした (n=4-5)。

C: メバロン酸経路 (コレステロール合成経路) の略図。

**P < 0.01。

4. 考察

本研究では、HFD 誘導性肥満マウスにおいて骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去すると、ATMs の局所増殖やアポトーシスの変化ではなく脂肪組織へのマクロファージの走化性が低下することで ATMs 集積が軽減し、体重を変化させることなく耐糖能とインスリン抵抗性が改善することを示した。これらの変化には血漿中の TNF- α 濃度および脂肪組織における炎症誘発性遺伝子の発現の低下を伴っていた。また HFD 誘導性肥満マウスにおいて骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去すると、肝臓における *Cd36* と *Ppar γ* の遺伝子発現が低下することによって、脂肪肝が減弱することを示した。

肥満マウスにおいては骨髄由来のマクロファージが脂肪組織に動員されることが報告されている (2)。CCR (C-C motif chemokine receptor) 2 および CCR5 はマクロファージの走化性において重要な役割を果たしている。マクロファージの *Ccr2* をノックダウンすると、主に ATMs の集積が減少することによって脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性が軽減することが報告されている (2, 27)。これらの報告と一致して、本研究では *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウス由来のマクロファージは走化性が低下しており、主に脂肪組織への動員が低下することによって ATMs 数が減少することを示した (図 8, 13, 20)。最近、骨髄細胞特異的に fatty acid synthase (*Fas*) を欠損させると、食餌誘導性の肥満マウスにおいてインスリン抵抗性や ATMs の集積が軽減し、慢性炎症が減弱することが報告された (28)。この研究では *Fas* 欠損細胞の細胞膜、とりわけ脂質ラフトの組成の変化が RhoA のようなシグナル分子の集合を阻害し、それによって脂肪組織へのマクロファージの動員が減少したと報告している。マクロファージの *Hmgcr* を除去すると、コントロールと比較し膜結合型の RhoA の発現が変化することが示されている (12)。また、骨髄細胞特異的な *Fas* 欠損と *Hmgcr* 欠損の両方のモデルでは、食餌誘導性の肥満マウスにおいてインスリン抵抗性や ATMs の集積が軽減するという同様の表現型が示されている。これらのことをまとめると、マクロファージの *Hmgcr* を除去すると *Fas* 欠損細胞と同様に脂質ラフトの組成が変化し、それによって走化性が低下している可能性が考えられる。*Hmgcr* が除去されたマクロファージにおいて、その走化性が低下する詳細な機序を明らかとするにはさらなる研究が必要である。

骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去すると、HFD 誘導性肥満マウスにおいて脂肪組織の炎症およびインスリン抵抗性が軽減するだけでなく、脂肪肝も軽減した。*Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較し *Hmgcr^{m/m}* マウスの肝臓では、脂肪酸トランスポーターである *Cd36* と *Cd36* を正に調節する *Ppar γ* の遺伝子発現が有意に低下していた (図 15)。*Cd36* の遺伝子発現はマウスの肝臓において、TG の蓄積と

正に相関している (29)。同様に、ヒトの non-alcoholic steatohepatitis (NASH) においても CD36 の発現は肝臓での TG 蓄積やインスリン抵抗性、高インスリン血症と相関している (30)。高インスリン血症は肝臓において *Ppar γ* 依存性に *Cd36* の遺伝子発現を増加させ、肝臓でのインスリン抵抗性や脂肪肝形成と関連している (31)。一方で、肝細胞特異的に *Cd36* を欠損させたマウスでは、HFD 条件下で肝臓の TG 含量が低下しインスリン感受性が改善した (32)。これらの観察に基づくと、高インスリン血症およびインスリン抵抗性の改善によって肝臓の *Cd36* の遺伝子発現が *Ppar γ* 依存性に低下し、脂肪酸の取り込みが低下することで HFD 条件下の *Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較して *Hmgcr^{m/m}* マウスにおいて脂肪肝が軽減したと考えられる。

スタチンは糖尿病の新規発症リスクを約 9% 増加させることが報告されている (33)。スタチンは膵 β 細胞からのインスリン分泌を抑制することで耐糖能異常を生じる可能性が報告されている (34, 35)。また脂肪細胞や骨格筋細胞におけるインスリン感受性を低下させることによって耐糖能を悪化させることも報告されている (36, 37)。インスリン抵抗性におけるスタチンの脂肪組織への影響に関して、スタチンはマクロファージのインフラマソームを活性化することで脂肪組織のインスリン抵抗性を引き起こすという報告 (38) がある一方で、肥満マウスにおいて脂肪組織の炎症を部分的に弱めるという報告 (39) もある。しかしスタチンの薬理的効果のいくつかは標的外効果 (off-target effects) によって仲介される可能性があるため、スタチンの結果を解釈するには注意が必要である (40)。本研究では、HFD 条件下で ATMs における *Tnf- α* や *Il-1 β* 、*Il-6* といった炎症誘発性サイトカインの mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差は認めなかったが、*Hmgcr^{fl/fl}* マウスと比較して *Hmgcr^{m/m}* マウスでは ATMs の集積が低下し、HFD により誘導されるインスリン抵抗性が減弱しており、スタチンによる耐糖能悪化の報告と異なるものであった。

in vitro において、*Hmgcr^{fl/fl}* マウス由来の TGEMs と比較して *Hmgcr^{m/m}* マウス由来の TGEMs では、細胞増殖が低下していることが示されている (12)。しかし本研究では、HFD 条件下の *Hmgcr^{m/m}* マウスから単離した ATMs において細胞増殖の低下は検出できなかった (図 13)。また、*Hmgcr^{fl/fl}* マウス由来の TGEMs と比較して *Hmgcr^{m/m}* マウス由来の TGEMs では、タプシガルギン誘導性のアポトーシスが増加していることが示されている (12)。しかし本研究では、2 群のいずれのマウスの ATMs においても、アポトーシスはごくわずかであった (図 13)。このような *in vitro* での表現型は、*in vivo* での食餌誘導性の動脈硬化モデルマウスにおいても再現されなかった (12)。*in vitro* におけるアポトーシスの結果と *in vivo* におけるアポトーシスの結果の違いには、肥満による ATMs の生存の増加が影響しているかもしれない (22)。別の可能性としては、

*in vivo*でのATMsにおける小胞体ストレスは、*in vitro*でのタプシガルギンによって誘導された小胞体ストレスほど強くなくアポトーシスが増加しなかったということも考えられる(12)。しかし細胞増殖に関しては、なぜ*in vitro*と*in vivo*において結果が異なるかということは明らかでない。*in vivo*において、なぜ細胞増殖が減少していないのかを明らかとするにはさらなる研究が必要である。

本研究における *Hmgcr^{m/m}*マウスでは、顆粒球においても *Hmgcr*が除去されているため(12)、単球・マクロファージ以外の骨髄細胞がこの表現型に関与している可能性を完全には除外できていない。実際、好酸球や好中球といった顆粒球も肥満における脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性の形成に関与している(41, 42)。しかし、他の骨髄系細胞よりも、ATMsは脂肪組織の炎症において主要な役割を果たしていると思われる。

TNF- α は肥満のラットにおけるインスリン抵抗性の形成に重要な役割を果たすことが報告されている(19)。しかしメタボリックシンドローム患者においてTNF- α を中和しても、ヒトにおけるインスリン抵抗性は改善しなかった(43)。またIL-18も脂肪細胞におけるインスリン抵抗性の原因となることが報告されている(44)。しかしヒトにおいてTNF- α を中和した報告と同様に、2型糖尿病患者においてIL-18受容体拮抗薬はインスリン抵抗性を改善しなかった(45)。これらの報告と本研究の結果からは、炎症誘発性サイトカインを標的とするよりも、マクロファージおよびその運動性を標的とすることがインスリン抵抗性を改善するためのより有望な治療戦略となりうることが示唆される。

5. 結語

骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去すると、食餌誘導性肥満モデルにおける脂肪組織へのマクロファージの動員が低下するために、ATMs の集積に反映される脂肪組織の炎症が減弱し、耐糖能とインスリン感受性が改善した。また肝臓における *Cd36* と *Ppar γ* の遺伝子発現が低下するため、脂肪肝も軽減した。従って、骨髄細胞の HMGCR は、肥満に伴うインスリン抵抗性と脂肪肝を改善しうる有望な治療標的として期待される。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導いただきました自治医科大学内科学講座内
分泌代謝学部門教授 石橋俊先生、自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門
講師 永島秀一先生に深く感謝いたします。

また研究の計画・遂行にあたり、自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門の
皆様には並々ならぬご助言とご協力をいただきました。心より御礼を申し上げます。

7. 引用文献

1. McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity*. 41:36-48, 2014.
2. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112:1796-808, 2003.
3. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 117:175-84, 2007.
4. Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*. 8:301-9, 2008.
5. Ramkhelawon B, Hennessy EJ, Ménager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, Wanschel A, Oldebeken S, Geoffrion M, Spiro W, Miller G, McPherson R, Rayner KJ, Moore KJ. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med*. 20:377-84, 2014.
6. Feng B, Jiao P, Nie Y, Kim T, Jun D, van Rooijen N, Yang Z, Xu H. Clodronate liposomes improve metabolic profile and reduce visceral adipose macrophage content in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 6:e 24358, 2011.
7. Bu L, Gao M, Qu S, Liu D. Intraperitoneal injection of clodronate liposomes eliminates visceral adipose macrophages and blocks high-fat diet-induced weight gain and development of insulin resistance. *AAPS J*. 15:1001-11, 2013.
8. Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, Kern PA. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes*. 54:2305-13, 2005.
9. Koppaka S, Kehlenbrink S, Carey M, Li W, Sanchez E, Lee DE, Lee H, Chen J, Carrasco E, Kishore P, Zhang K, Hawkins M. Reduced adipose tissue macrophage content is associated with improved insulin sensitivity in thiazolidinedione-treated diabetic humans. *Diabetes*. 62:1843-54, 2013.
10. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343:425-30, 1990.

11. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res.* 120:229-243, 2017.
12. Sakai K, Nagashima S, Wakabayashi T, Tumenbayar B, Hayakawa H, Hayakawa M, Karasawa T, Ohashi K, Yamazaki H, Takei A, Takei S, Yamamuro D, Takahashi M, Yagyu H, Osuga JI, Takahashi M, Tominaga SI, Ishibashi S. Myeloid HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A) Reductase Determines Atherosclerosis by Modulating Migration of Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38:2590-2600, 2018.
13. Nagashima S, Yagyu H, Ohashi K, Tazoe F, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalan T, Okada K, Sekiya M, Osuga J, Ishibashi S. Liver-specific deletion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase causes hepatic steatosis and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:1824-31, 2012.
14. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8:265-77, 1999.
15. Gumbilal V, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Ebihara C, Zhao M, Yamamoto Y, Mashimo T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K. Fat Mass Reduction With Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance in Heterozygous PPAR γ Mutant Rats. *Diabetes.* 65:2954-65, 2016.
16. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 46:2347-55, 2005.
17. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:79-83, 1999.
18. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T.

- The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* 7:941-6, 2001.
19. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259:87-91, 1993.
 20. Ratter JM, Tack CJ, Netea MG, Stienstra R. Environmental Signals Influencing Myeloid Cell Metabolism and Function in Diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 29:468-480, 2018.
 21. Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yawe JC, Shen Y, Czech MP, Aouadi M. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* 19:162-171, 2014.
 22. Hill AA, Anderson-Baucum EK, Kennedy AJ, Webb CD, Yull FE, Hasty AH. Activation of NF- κ B drives the enhanced survival of adipose tissue macrophages in an obesogenic environment. *Mol Metab.* 4:665-77, 2015.
 23. Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278:46654-60, 2003.
 24. Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond).* 29:146-50, 2005.
 25. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.* 281:26602-14, 2006.
 26. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 116:1494-505, 2006.
 27. Kim J, Chung K, Choi C, Beloor J, Ullah I, Kim N, Lee KY, Lee SK, Kumar P. Silencing CCR2 in Macrophages Alleviates Adipose Tissue

- Inflammation and the Associated Metabolic Syndrome in Dietary Obese Mice. *Mol Ther Nucleic Acids*. 5:e280, 2016.
28. Wei X, Song H, Yin L, Rizzo MG, Sidhu R, Covey DF, Ory DS, Semenkovich CF. Fatty acid synthesis configures the plasma membrane for inflammation in diabetes. *Nature*. 539:294-298, 2016.
 29. Hui ST, Parks BW, Org E, Norheim F, Che N, Pan C, Castellani LW, Charugundla S, Dirks DL, Psychogios N, Neuhaus I, Gerszten RE, Kirchgessner T, Gargalovic PS, Lusis AJ. The genetic architecture of NAFLD among inbred strains of mice. *Elife*. 4:e05607, 2015.
 30. Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sánchez-Campos S, García-Mediavilla MV, Fernández-Bermejo M, Lozano-Rodríguez T, Vargas-Castrillón J, Buqué X, Ochoa B, Aspichueta P, González-Gallego J, García-Monzón C. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. 60:1394-402, 2011.
 31. Steneberg P, Sykaras AG, Backlund F, Straseviciene J, Söderström I, Edlund H. Hyperinsulinemia Enhances Hepatic Expression of the Fatty Acid Transporter Cd36 and Provokes Hepatosteatosis and Hepatic Insulin Resistance. *J Biol Chem*. 290:19034-43, 2015.
 32. Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology*. 157:570-85, 2016.
 33. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, Seshasai SR, McMurray JJ, Freeman DJ, Jukema JW, Macfarlane PW, Packard CJ, Stott DJ, Westendorp RG, Shepherd J, Davis BR, Pressel SL, Marchioli R, Marfisi RM, Maggioni AP, Tavazzi L, Tognoni G, Kjekshus J, Pedersen TR, Cook TJ, Gotto AM, Clearfield MB, Downs JR, Nakamura H, Ohashi Y, Mizuno K, Ray KK, Ford I. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*. 375:735-42, 2010.
 34. Metz SA, Rabaglia ME, Stock JB, Kowluru A. Modulation of insulin secretion from normal rat islets by inhibitors of the post-translational modifications of GTP-binding proteins. *Biochem J*. 295:31-40, 1993.

35. Ishikawa M, Okajima F, Inoue N, Motomura K, Kato T, Takahashi A, Oikawa S, Yamada N, Shimano H. Distinct effects of pravastatin, atorvastatin, and simvastatin on insulin secretion from a beta-cell line, MIN6 cells. *J Atheroscler Thromb*. 13:329-35, 2006.
36. Nakata M, Nagasaka S, Kusaka I, Matsuoka H, Ishibashi S, Yada T. Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. *Diabetologia*. 49:1881-92, 2006.
37. Kain V, Kapadia B, Misra P, Saxena U. Simvastatin may induce insulin resistance through a novel fatty acid mediated cholesterol independent mechanism. *Sci Rep*. 5:13823, 2015.
38. Henriksbo BD, Lau TC, Cavallari JF, Denou E, Chi W, Lally JS, Crane JD, Duggan BM, Foley KP, Fullerton MD, Tarnopolsky MA, Steinberg GR, Schertzer JD. Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance. *Diabetes*. 63:3742-7, 2014.
39. Abe M, Matsuda M, Kobayashi H, Miyata Y, Nakayama Y, Komuro R, Fukuhara A, Shimomura I. Effects of statins on adipose tissue inflammation: their inhibitory effect on MyD88-independent IRF3/IFN-beta pathway in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28:871-7, 2008.
40. Schirris TJ, Renkema GH, Ritschel T, Voermans NC, Bilos A, van Engelen BG, Brandt U, Koopman WJ, Beyrath JD, Rodenburg RJ, Willems PH, Smeitink JA, Russel FG. Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition. *Cell Metab*. 22:399-407, 2015.
41. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 332:243-7, 2011.
42. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*. 18:1407-12, 2012.
43. Bernstein LE, Berry J, Kim S, Canavan B, Grinspoon SK. Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome. *Arch Intern Med*. 166:902-8, 2006.

44. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 148:241-51, 2007.
45. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 356:1517-26, 2007.