

氏名	武井 暁一
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 582 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 岩本 禎彦 (委員) 教授 小谷 和彦 教授 原 一雄

論文内容の要旨

1 研究目的

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。一方で ATMs 集積の抑制により、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。

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る。骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を遺伝的に除去した (*Hmgcr^{m/m}*) マウスでは、マクロファージの *Hmgcr* 活性が半減し遊走能が低下することを最近我々は見出した。高コレステロール血症にした際に形成される動脈硬化は、*Hmgcr^{fl/fl}* マウスに比して *Hmgcr^{m/m}* マウスでは軽症化した。肥満すると脂肪組織へのマクロファージの動員が亢進しインスリン抵抗性形成に寄与することが知られているが、*Hmgcr^{m/m}* マウスでは脂肪組織へのマクロファージの動員が低下する結果、ATMs 数が減少し、インスリン感受性の改善も期待されると仮定した。そこで本研究では食餌誘発性肥満 (diet-induced obesity : DIO) モデルを用いて、この仮定の検証を試みた。

2 研究方法

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を *Hmgcr^{fl/fl}* マウスに交配することにより *Hmgcr^{m/m}* マウスを作製した。

in vivo では、8 週齢の雄マウスを通常食 (normal chow diet : NCD) または高脂肪食 (high-fat diet : HFD) で 24 週間飼育し体重推移や組織重量、体組成、摂餌量、血中脂質を測定した。また耐糖能およびインスリン抵抗性の解析のために、空腹時血糖やインスリン値を測定し、経口ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行い、肝臓、精巣上体脂肪組織、腓腹筋におけるインスリンシグナルの解析を行った。さらに各組織におけるマクロファージの数や活性化状態、ATMs における細胞増殖や細胞死を組織学的手法や遺伝子発現解析を用いて評価した。

in vitro では、2 群のマウスから単離したチオグリコレート誘導性マクロファージ (thioglycolate-elicited macrophages : TGEMs) の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-

1) に対する走化性を解析した。

3 研究成果

体重推移や精巣上体脂肪組織の重量、肝臓の重量、摂餌量は、NCD および HFD 条件下のそれぞれの 2 群間において有意な差はなかった。また体組成および血漿脂質値は HFD 条件下の 2 群間において有意な差はなかった。

NCD 条件下では、耐糖能およびインスリン抵抗性は 2 群間に有意差はなかった。しかし HFD 条件下では *Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスの空腹時血糖や空腹時血漿インスリン値、HOMA-IR は有意に低下した。経口ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験の結果、*Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスでは、耐糖能とインスリン感受性が改善していた。さらに、インスリン投与後の Akt のリン酸化の増加を指標として各組織におけるインスリン感受性を評価した。Akt のリン酸化の増加幅は、*Hmgcr*^{fl/fl}マウスと比して *Hmgcr*^{m/m}マウスの肝臓では 1.5 倍、精巣上体脂肪組織では 2 倍、腓腹筋では 3 倍に有意に増加していた。従って、DIO によって誘導されるインスリン抵抗性は骨髄細胞における *Hmgcr* の遺伝的除去によって緩和されることが示された。

精巣上体脂肪組織の crown-like structure 数は *Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで 77%有意に低下した。これに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 tumor necrosis factor- α (*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、*Hmgcr*^{fl/fl}マウスと比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで有意に低下していた。一方で *Cd206* や *Cd163* といった M2 マーカーの mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。また脂肪細胞に由来しインスリン感受性を改善するアディポネクチンの mRNA 発現レベルは、*Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで有意に上昇しており、血漿中の TNF- α 濃度は *Hmgcr*^{fl/fl}マウスと比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで有意に低下した。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。単離した ATMs においては、炎症誘発性サイトカインの遺伝子発現に有意差はなく、脂肪組織内での ATMs の細胞増殖やアポトーシスは 2 群間で有意差はなかった。

HFD 条件下における肝臓のトリグリセリド含量は *Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで 52%有意に低下した。また肝臓における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 mRNA 発現レベルは、*Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで有意に低下していた。一方、脂質生成や脂肪酸酸化、very low-density lipoprotein (VLDL) の分泌に関わる遺伝子の mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。肝臓の F4/80 陽性マクロファージの数は 2 群間で有意差はなく、マクロファージ全般・炎症性の M1・抗炎症性の M2 マーカー遺伝子の mRNA 発現レベルにも 2 群間で有意差はなかった。

腓腹筋のトリグリセリド含量は *Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで 18%有意に低下した。マクロファージ全般および炎症性の M1 マーカー遺伝子の mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差はなかった。

Hmgcr^{fl/fl}マウスから単離した TGEMs に比して *Hmgcr*^{m/m}マウスから単離した TGEMs で MCP-1 に対するマクロファージの走化性は 54%有意に低下していた。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。

4 考察

骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去すると、DIO モデルにおいて ATMs 集積を軽減し、体重を変化させることなく耐糖能とインスリン感受性を改善した。これらの変化には脂肪組織における *Tnf- α* を含む炎症誘発性遺伝子の発現の低下を伴っていた。ATMs における炎症誘発性遺伝子の発現は 2 群間で有意差がなく、ATMs 集積の軽減によってインスリン抵抗性が改善したと考えられた。ATMs の局所増殖やアポトーシスへの影響は認められない一方、MCP-1 へのマクロファージの走化性は、*Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウス由来の TGEMs で低下を認めた。従って、*Hmgcr* が遺伝的に除去された単球・マクロファージは脂肪組織への遊走・浸潤が低下し、ATMs 集積が軽減したと考えられた。そして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。

また、肝臓トリグリセリドの蓄積も、*Hmgcr*^{fl/fl}マウスに比して *Hmgcr*^{m/m}マウスで有意に抑制された。肝臓マクロファージ数や炎症誘発性遺伝子発現に 2 群間で有意差はなかった。一方、*Cd36* と *Ppar γ* の遺伝子発現の低下が確認され、脂肪酸の取り込みの低下により脂肪肝が減弱した可能性が考えられた。

5 結論

骨髄細胞特異的に *Hmgcr* を除去すると、DIO 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。

論文審査の結果の要旨

本学位論文はスタチンが血中コレステロール値低下作用だけでなく、単球・マクロファージに対する作用を介して抗動脈硬化作用を発揮している可能性を明らかにするために、コレステロール合成の律速酵素でありスタチンの主な薬理作用のターゲットである HMG-CoA 還元酵素を骨髄細胞特異的にノックアウトしたマウスを用いて、様々な実験を行った。その結果、ノックアウトマウスはコントロールマウスに比べ、高脂肪食誘導性肥満による体重増加に差は認められないにもかかわらず、脂肪組織へのマクロファージの走行性ととも血中 TNF- α は低下し、耐糖能とインスリン抵抗性が改善することを明らかにした。この結果は、スタチンは糖尿病新規発症リスクを上昇させるという臨床的観察と相反するものであり、新規発見である。さらにマクロファージのケモカインに対する走化性は、メバロン酸の添加によって回復するが、コレステロール合成中間代謝物であるスクワレンでは回復しないことを見出した。以上の結果と M1M2 マクロファージのサイトカイン発現解析などから、脂肪組織浸潤性マクロファージをネガティブに制御することによってインスリン抵抗性を改善できる可能性を示した。これらの発見によって、インスリン抵抗

性や脂肪肝の新たな治療ターゲットの糸口がもたらされる可能性があり、学術的意義だけでなく臨床的にもインパクトのある発見と考えられた。

Thesis に関しては、実験結果の解釈や実験の限界、科学的日本語文章表現に問題点を指摘され、それに添って申請者は修正するとともに、新たなデータを追加することによって結果の補強を行った。この修正に対し、審査員一同、改善されたことを認め学位論文として相応しいと判断した。

最終試験の結果の要旨

発表は、本論文の背景をより詳細に説明した後、結果については次に示す Thesis の主たる項目に添って行われた。

- ・ 骨髄細胞特異的 HMG-CoA 還元酵素ノックアウトマウスの表現型解析
- ・ 耐糖能とインスリン抵抗性の解析
- ・ 脂肪組織浸潤マクロファージと脂肪細胞の形態、遺伝子発現の評価
- ・ 肝臓、腓腹筋における脂肪沈着の評価
- ・ マクロファージの MCP-1 に対する走化性の解析

対象と方法、結果とその解釈を明快に説明し、研究の全体を分かりやすく提示できた。また、研究の背景と解決すべき問題点を明らかにし、その解析技術に関しても十分な知識と能力を有していると判断された。発表後に審査委員からは以下のような質問があった。

- ・ ノックアウトマウスの動脈硬化性病変についての検討の有無
- ・ 脂肪組織浸潤 M1M2 比について
- ・ 脂肪細胞の大きさについて差は認められたかどうか
- ・ メバロン酸の *in vivo* 投与の可能性と予想される結果について

これらの質問に対して、申請者からは迅速で概ね適切かつ誠実な返答が得られ、論文中にその内容が加筆されることとなったものの、申請者の学識及び研究能力は学位授与に十分値するものと審査員全員一致で判断した。