

## 研究テーマ

### 血管病巣部マクロファージの機能制御による動脈硬化の新しい治療法開発を目指して

#### 1. はじめに

動脈硬化は、国内外において最も高い死因となる疾患の一つであり、様々な脳疾患や心疾患の基礎病変となるメタボリックシンドロームである。我々は、動脈硬化巣に蓄積する泡沫化マクロファージが核内レセプターLXRの活性化によりAIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophages) というアポトーシス抑制因子を強く発現していることを発見した<sup>1)</sup>。AIMはマクロファージによって賛成される、分泌型タンパク質である<sup>2)</sup>。そのため、硬化巣のマクロファージは常に毒性の強い酸化コレステロールに曝されているにもかかわらず AIM を産生することによりアポトーシス抵抗性を呈することで、病巣における泡沫化マクロファージの蓄積を増徴し、病態を増悪しており、AIM を欠損した状態では、動脈硬化モデルマウスに生じた動脈硬化巣においてマクロファージが激しくアポトーシスにおちいるため、病変が著しく軽減することが我々の研究によって明らかになっている<sup>1)</sup>。本研究では、AIM を用いて病変部マクロファージの機能制御を行うことで、これまでに無い新しい動脈硬化治療を開発することを目的とし、AIM 受容体の単離や AIM の機能についての探索を行ったが、その過程で、新しい AIM の機能として、AIM が脂肪細胞に取り込まれ、脂肪滴の融解を誘導することを見出した<sup>3)</sup>。AIM が動脈硬化だけでなく肥満等のメタボリックシンドロームにも深く関与していることが示され、非常に重要な発見であると考えられる。ここにその成果を紹介させていただく。

#### 2. 方法

リコンビナントAIM (rAIM) の精製: C末端にHAタグを付加したマウスAIM (mAIM) をコードした発現ベクター pCAGGS-mAIM-HA を電穿孔法により HEK293T 細胞にトランスフェクションし、無血清培地 (FreeStyle™293 Expression Medium; Invitrogen) 中で培養した。培養上清を抗HA抗体カラムを用いて rAIM-HA を精製した。

3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化: 3T3-L1細胞を2日間培養してコンフルエントにし、インスリン (1 µg/ml)、Dexamethasone (1 µM)、IBMX (0.5 mM)、を含んだ10%FBS-DMEM培地で2日間刺激した。その後インスリン (1 µg/ml) を含んだ培地で2日毎に培地交換した。

グリセロールおよび遊離脂肪酸の測定: 分化誘導後6日目の脂肪細胞に5 µg/mlのrAIMもしくはBSAを加えて培養した。添加開始後、それぞれ2、4、6日目において、細胞を洗浄した後、無血清培地にて5時間培養した培養上清について含有グリセロール量および脂肪酸量を測定した。測定にはグリセロールアッセイキットおよび脂肪酸アッセイキット (Bio ision Inc.) を用いた。

#### 3. 結果 研究成果

##### (1) 脂肪細胞におけるAIMの取り込み

高脂肪食を負荷して肥満化したマウスの脂肪組織を抗AIM抗体によって染色すると、脂肪組織中のマクロファージ (図中F4/80<sup>+</sup>細胞) だけでなく、脂肪細胞においてもAIMのシグナルが検出された (図1A)。これま

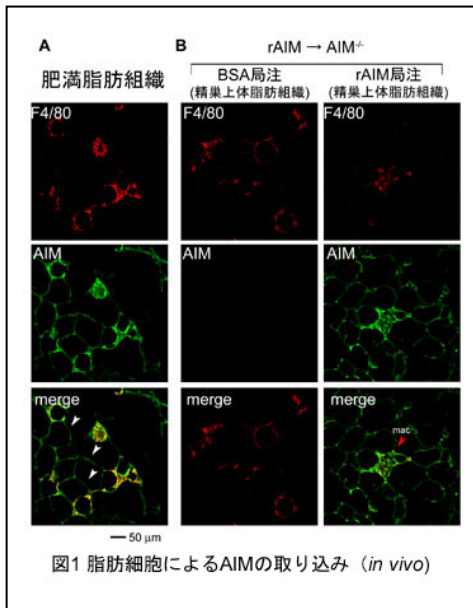


図1 脂肪細胞によるAIMの取り込み (in vivo)

でのところ、AIMはマクロファージ特異的に産生されると考えられていたため<sup>2)</sup>、我々は、脂肪細胞がAIMを産生しているのではなく、細胞外から脂肪細胞が取り込んだのではないかと考えた。実際に、肥満AIM<sup>-/-</sup>マウス精巣上体脂肪組織にrAIMを局所注射し、3時間後の脂肪組織について抗AIM抗体によって免疫組織化学染色を行ったところ、脂肪細胞の細胞質にAIMが存在していたことから(図1B)、脂肪細胞は細胞外のAIMを細胞内へ取り込むことが判明した。さらに、in vitro

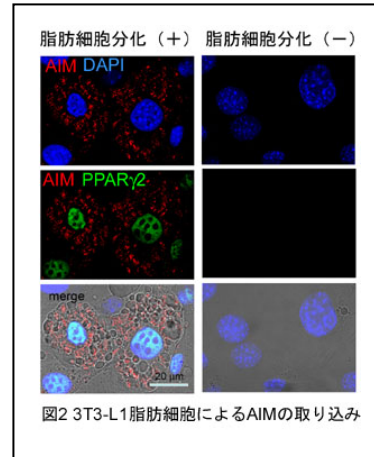


図2 3T3-L1脂肪細胞によるAIMの取り込み

に分化させた3T3-L1細胞にrAIMを添加すると、PPAR $\gamma$ 2を高発現した成熟脂肪細胞がAIMを取り込むことが確かめられた(図2)。

## (2) AIM受容体の同定

脂肪細胞におけるAIMの受容体として、我々はスカベンジャー受容体であるCD36に着目した。3T3-L1脂肪細胞にAIMを取り込ませる際に、CD36に対する中和抗体を添加すると、AIMの取り込みが阻害され(図3)、脂肪細胞では主にCD36を介してAIMの取り込みが行われていることが明らかになった。

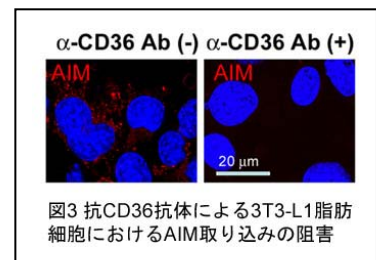


図3 抗CD36抗体による3T3-L1脂肪細胞におけるAIM取り込みの阻害

## (3) AIMによる脂肪滴融解の誘導

次に、AIMが脂肪細胞にどのような影響を与えるのかを調べるために、分化させた3T3-L1脂肪細胞にrAIMを添加し、6日間培養したところ、脂肪滴のサイズが縮小とともに、脂肪滴を含む細胞数の減少が観察された(図4)。同時に、rAIMの添加により培養液中のグリセロールと遊離脂肪酸の量が顕著に増加すること

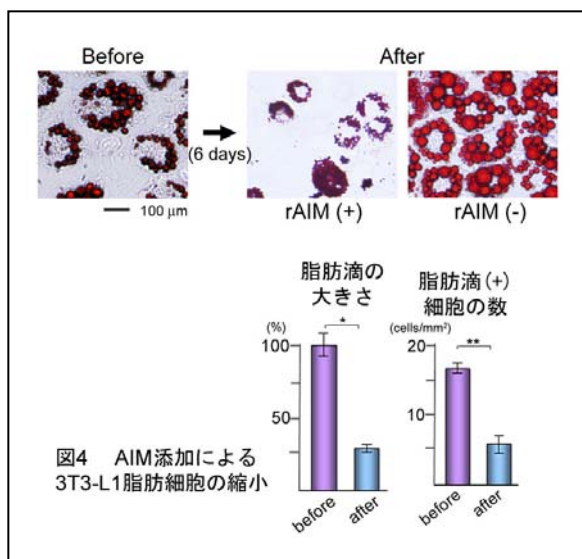


図4 AIM添加による3T3-L1脂肪細胞の縮小

から(図5)、AIMが脂肪細胞内に取り込まれることによって、脂肪(トリグリセリド)の融解が誘導されていることが示唆された。実際に肥満AIM<sup>-/-</sup>マウスの内臓脂肪の脂肪細胞は、肥満AIM<sup>+/+</sup>マウスのそれよりも細胞のサイズが小さかった(図6)。

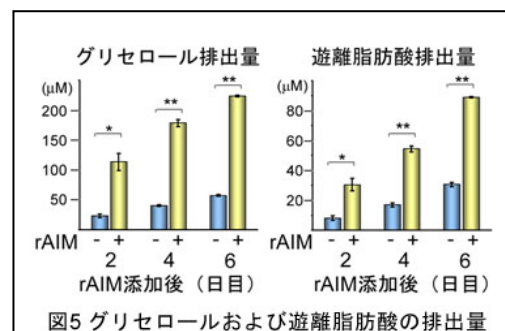


図5 グリセロールおよび遊離脂肪酸の排出量

#### 4. 考察・まとめ

本研究により、マクロファージが特異的に産生する分泌タンパク質であるAIMが、脂肪細胞において新しい機能を有することが明らかになった。AIMはCD36を介して脂肪細胞の内部に取り込まれることで脂肪滴の融解を誘導し、脂肪滴の縮小や減少が誘発されることが3T3-L1脂肪細胞を用いた*in vitro*の実験で示され

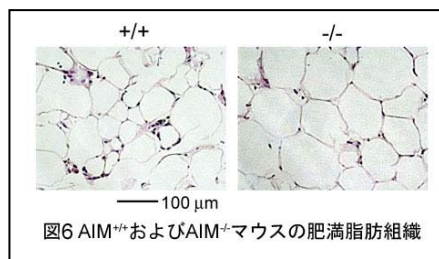


図6 AIM<sup>+/+</sup>およびAIM<sup>-/-</sup>マウスの肥満脂肪組織

た。さらに、実際にAIMを欠損したマウス(AIM<sup>-/-</sup>マウス)の脂肪細胞は、AIM<sup>+/+</sup>マウスのそれよりもサイズが大きいたことが判明した。このことから、AIMは肥満を中心としたメタボリックシンドロームの病態進行に深く関与していることが示唆された。今後、AIMの機能を制御することにより、肥満を引き金とする様々なメタボリックシンドロームの進行の制御や予防が期待できる。また、これまで示されてきたAIMのアポトーシス抑制機能と、この脂肪滴融解の間にどのような関連性があるのかは未だ明らかにされていないが、非常に興味深い点である。さらに、脂肪細胞におけるAIMの受容体はCD36であることが判明したが、CD36分子はマクロファージも発現していることから、CD36はマクロファージにおいても同様にAIM受容体として機能している可能性がある。今後、マクロファージにおけるAIMの結合や取り込み、そしてそのアポトーシス抑制の機構を解析するにあたり、この知見は非常に有用であると考えられる。新しい動脈硬化治療法開発の方面でもこれらの知見を活かしていきたいと考えている。

最後に、本研究を遂行するに当たり、本助成金を賜りました 財団法人 病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。

#### 5. 発表論文、参考文献

- 1) Arai, S., Shelton, J. M., Chen, M., Bradley, M. N., Castrillo, A., Bookout, A. L., Mak, P. A., Edwards, P. A., Mangelsdorf, D. J., Tontonoz, P. & Miyazaki, T. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development. **Cell Metab.** 1: 201-213 (2005).
- 2) Miyazaki, T., Hirokami, Y., Matsushashi, N., Takatsuka, H. & Naito, M. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cycteine-rich domain superfamily. **J. Exp. Med.** 189: 413-422 (1999).
- 3) Kurokawa, J., Arai, S., Nakashima, K., Nishijima, A., Miyata, K., Ose, R., Mori, M., Kubota, N., Kadowaki, T., Oike, Y., Koga, H., Febbraio, M., Iwanaga, T. & Miyazaki, T. AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. (2010) <under submission>.