

シアル酸結合レクチンによる食餌性脂質作用の調節

西 島 謙 一

名古屋大学大学院工学研究科 助教

緒 言

食習慣の欧米化に伴い我が国でも飽和脂肪酸の摂取量が増加傾向にあると推定されている。食後上昇する血中脂肪酸は、通常脂肪組織に吸収・蓄積されることで速やかに除去される。しかし、いわゆる生活習慣病においては血中脂肪酸濃度が高い状態が続き、健康を損なうもととなる。パルミチン酸など食餌由来の飽和脂肪酸は、強い炎症を引き起こす病原菌由来のリポポリサッカライド (LPS) と同様に、白血球の持つ危険センサーの一種 TLR4 により弱い炎症を引き起こすことが知られている。一方、インスリン非応答性 (II 型) 糖尿病や心筋梗塞などの生活習慣病は、自覚しない程度の弱い慢性炎症が原因であるとの説が有力となりつつある。そこで、本研究ではシアル酸結合タンパク質の持つ抗炎症機能を利用して、生活習慣病につながる慢性炎症を調節する可能性を検証する。

酸性糖の一種であるシアル酸はヒトのほとんどの糖鎖末端に存在する。シアル酸は下等生物にはほとんど見られず、免疫反応における自己と非自己の識別に適した性質を持っている。実際、補体系において自己免疫を抑制するための目印としてシアル酸を利用している例が知られている。最近発見されたシアル酸結合レクチンであるシグレックは、主に白血球の細胞表面に存在しており、細胞内ドメインに抑制性モチーフをもつことから、シアル酸の持つ免疫調節活性との関連が注目されてきた¹⁾。現在までに、Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞やマスト細胞の活性を抑制することが報告されている。

我々は炎症を引き起こす細胞であるマクロファージに着目し、シグレックが LPS など様々な病原菌由来の炎症誘導物質に対して、強い抗炎症作用を持つことを初めて明らかとしている²⁾。その抗炎症活性は、①マクロファージからの TNF- α などの炎症物質の産生量を低下させるだけでなく、②強い炎症抑制作用を持つサイトカイン IL-10 を多量に作らせるという二つの独立した経

路があることが、明らかとなっている。

本研究では飽和脂肪酸による弱い炎症がシグレックにより改善可能であるか検証するとともに、シグレックの発現を増強する条件を探索することをめざした。

実験方法

ヒトシグレック-9 を発現するマウスマクロファージ細胞株 RAW264 細胞²⁾ を、24 時間培養し、回収した上清中の炎症性サイトカイン TNF- α 及び抑制性サイトカイン IL-10 の量を、ELISA 法により測定した。炎症性サイトカインの発現誘導に重要な転写因子 NF- κ B の活性化は、通常は NF- κ B に結合して活性化を抑制しているタンパク質で、細胞が活性化されると分解される I κ B の量をウェスタンブロットで検出することで検証した。なお、パルミチン酸はウシ血清アルブミンと結合させて用いた。

骨髓細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下 5-8 日間培養しマクロファージに分化させた後、24 ウェルプレートに播種し、IL-4 (10U/ml) または IFN- γ (100 U/ml) 存在下 LPS (10 ng/ml) により 24 時間刺激した。細胞から RNA を抽出し、シグレックの発現量を RT-PCR により定量した。発現は、GAPDH またはアクチン遺伝子によって補正した。

結 果

1. 食餌由来飽和脂肪酸による炎症反応のシグレックによる抑制

白血球が持つ TLR は、本来病原菌の細胞壁成分を識別するレセプターであるが、パルミチン酸やステアリン酸等の食餌由来飽和脂肪酸は TLR を介して弱い炎症を引き起こすことが報告されている。RAW264 細胞を、食餌中に含まれる代表的な脂肪酸であるパルミチン酸存在下 24 時間培養した。培養後の上清中に含まれる TNF- α の量を測定した。その結果、シグレックを発現

させていない RAW264 が有意に TNF- α を産生していたのに対し、シグレック発現 RAW264 ではほとんど TNF- α の産生が認められなかった (図 1 A)。パルミチン酸の濃度依存性について検討したところ、シグレック非発現 RAW264 細胞では 400 - 1000 μ M の範囲で徐々に TNF- α の産生量が増大するのに対し、シグレック発現 RAW264 細胞ではほとんど変化が認められなかった (図 1 B)。シグレック発現・非発現細胞ともに、低濃度のパルミチン酸により若干の TNF- α 産生量の減少が認められた。

シグレックによる TNF- α 産生量減少のメカニズムとして、TNF- α 遺伝子の発現を活性化する転写因子 NF- κ B の関与の可能性を検討した。TNF- α 産生量の大きい LPS による刺激を用いて、細胞の活性化にともない分解される I κ B の量の変化を検討した。シグレック非発現細胞では、約 15 分で I κ B の量が顕著に減少していることが確認された (図 2)。シグレック発現細胞においても、同様のタイムコースで I κ B の量は減少したが、その減少の程度は明らかに弱いものであった。このことから、

シグレックによる TNF- α 産生量減少は NF- κ B 活性化の抑制によることが示唆された。同じ TLR により活性化されるパルミチン酸の場合も、同様に NF- κ B 経路による抑制であることが推定された。我々は既にシグレックが TNF- α だけでなく他の炎症性サイトカイン IL-6 や抗ウイルス作用を持つ IFN- β の産生も抑制することを報告している²⁾が、これらのサイトカイン共通の転写因子として NF- κ B があげられる。今回の知見はシグレックが炎症性サイトカインを抑制するための共通のメカニズムとして NF- κ B を調節している可能性を示唆するものである。

一方、我々のこれまでの研究においてシグレック発現 RAW264 細胞において産生が強く認められた抑制性サイトカイン IL-10 は今回の条件では検出限界以下であった (データ省略)。IL-10 産生の欠如が LPS やペプチドグリカンなどの強い刺激とパルミチン酸による刺激との質的な差違なのかについては今後の検討が必要である。

これらの結果から、シグレックを発現したマクロファージでは食餌性脂肪酸による TNF- α の生産量が低いことが示された。慢性的に生産される低レベル TNF- α は、動脈硬化や心臓疾患など様々な生活習慣病の増悪因子であることが示唆されていることから、マクロファージのシグレック発現量を増強させることが出来れば、これらの疾患の悪化防止等に役立つ可能性が示唆された。

2. シグレックの発現を誘導する成分の探索

ある種のシグレックはマクロファージや樹状細胞などの白血球が成熟していく過程で発現が増すことが知られる。しかし、その発現を調節する仕組みは全く明らかにされていない。そこで、マクロファージのシグレック発現を制御する食物因子の探索に先立ち、マクロファージ

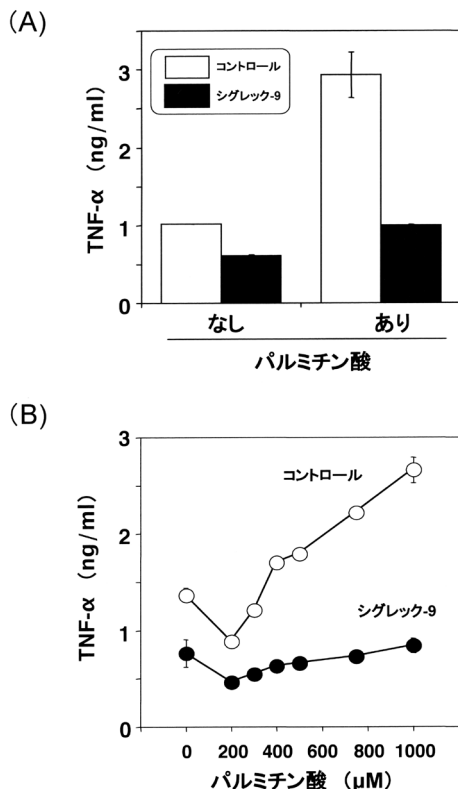


図 1 シグレックによるパルミチン酸誘導 TNF- α 産生の抑制

(A) シグレック発現 / 非発現 (コントロール) RAW264 を 500 μ M パルミチン酸存在下 24 時間培養し、上清中の TNF- α を定量した。

(B) 同様にパルミチン酸の濃度依存性を検討した。

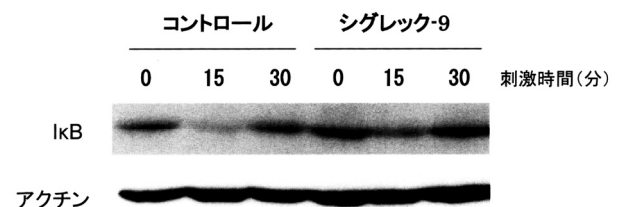


図 2 シグレックによる NF- κ B 経路の抑制

シグレック発現 / 非発現 (コントロール) RAW264 を LPS により表示した時間刺激し、細胞質中に存在する抑制因子 I κ B の量をウェスタンブロットにより検出した。(アクチン: ロードコントロール)

活性を調節するサイトカインによるシグレックの発現量変化を検討した。

骨髓細胞を *in vitro* で M-CSF により刺激することで分化させたマクロファージを用いた。通常の炎症を誘導する刺激としては IFN- γ 存在下 LPS を加えた。一方、組織再生を起こすとされる M2 マクロファージを誘導しやすい条件として IL-4 を用い、24 時間培養することでシグレックの発現量が変化するかどうかを RNA レベルで検定した。

LPS の刺激によって大量に産生される一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を炎症性マクロファージの、またレクチンの一種であるマンノースレセプターを組織修復型マクロ

ファージのマーカーとして、誘導した細胞の性質を確認した (図 3 A)。この際のシグレックの発現を RNA レベルで定量した。その結果、IL-4 誘導型マクロファージでシグレック-G の発現が増すことが認められた (図 3 B)。一方、IFN- γ と LPS の刺激ではシグレック-G の発現は減少した。また、シグレック-F は IFN- γ と LPS の刺激で、シグレック-E は IL-4 刺激で減少した。シグレック-H、CD33 (シグレック-3) はどちらの刺激でもやや減少した。

考 察

古くから炎症を引き起こす細胞としてとらえられてい

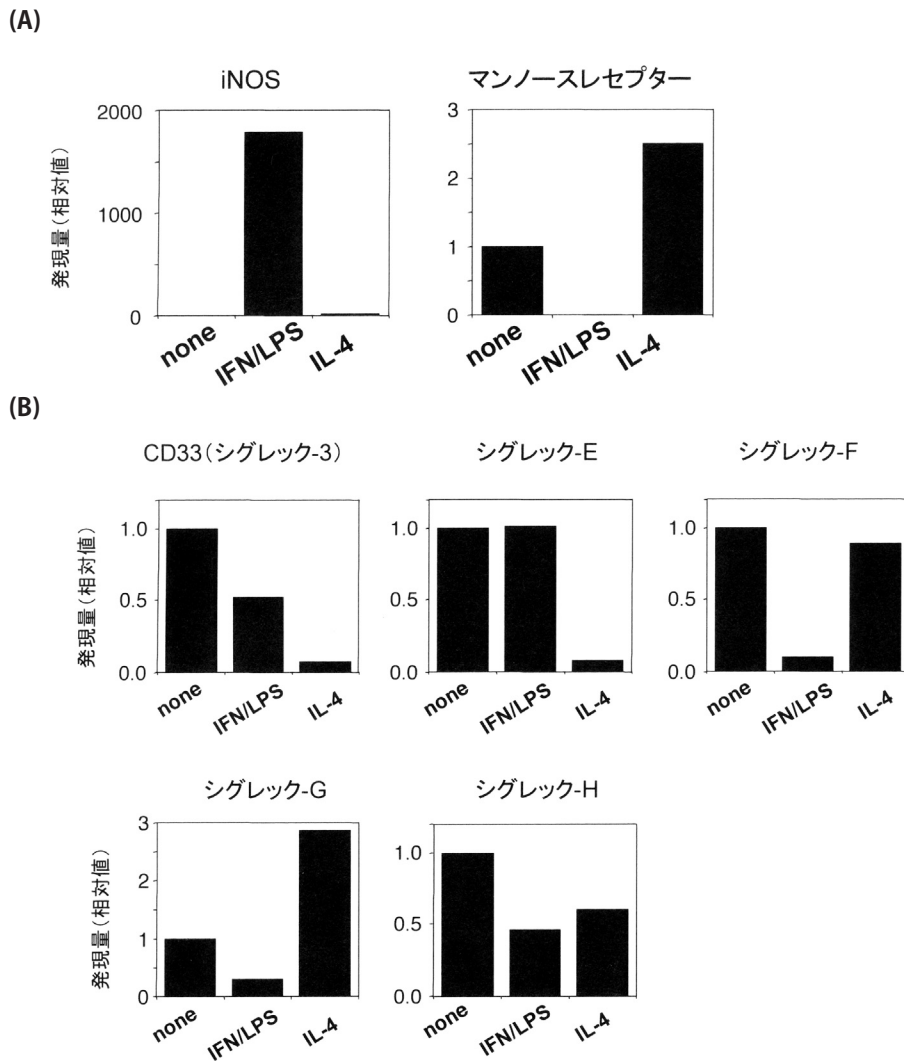


図 3 サイトカインによるシグレック発現量の変化

骨髓から M-CSF により分化させたマクロファージを図に示した条件下で 24 時間培養し、RNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法により定量した。

(A) 炎症型、組織修復型マクロファージマーカーの発現検定。結果は刺激なしの条件 (none) を 1 とした相対値で示した。

(B) マウスシグレックファミリーの発現強度の検定。

たマクロファージには多様性があることが明らかとなりつつあり、炎症を減弱する活性を持つ細胞も存在することが注目されている³⁾。本研究においてはマクロファージ表面上で糖を認識するレクチンタンパク質シグレックを用いて、マクロファージの性質を抗炎症性に変換し、食餌性脂質の生理作用をコントロールする可能性が示されたと言える。食餌中の脂質は優れたエネルギー源であるにもかかわらず、食習慣を含めた現在の生活の変化により、健康を損なう原因となるケースが増えている。「炎症体質」改善にむけて、シグレックの発現を増強できる物質が利用可能であると考えられる。本研究ではIL-4などのサイトカインによりシグレックの発現が変化しうることが示唆されており、今後食成分等よりその発現を制御できる物質が見つけられれば、サプリメントなどへの利用が期待できる。現在、このような物質の検索を進めている。

一方、今回の実験条件ではいくつか存在するシグレックファミリー分子全てを同時に増強あるいは抑制できる条件は見つかっておらず、個々の発現変化がマクロファージそのものの性質に及ぼす影響について今後詳細に検討してゆく必要がある。現在それぞれのシグレックの役割を直接明らかにするために、調製した初代培養マクロファージにレンチウイルスベクターによりシグレック遺伝子を導入・発現させるための準備を進めている。ウイルスベクターコンストラクトの作製は済んでおり、

今後解析を行う予定である。

要 約

食餌由来の飽和脂肪酸は、弱い炎症を引き起こす活性が知られ、インスリン非応答性糖尿病などの生活習慣病の原因となる可能性が指摘されている。本研究ではマクロファージが持つ細胞性レクチンシグレックが飽和脂肪酸による弱い炎症を抑制可能であることが示唆された。一方、初代培養マクロファージを用いた解析では、炎症抑制効果と関連すると想定されるシグレックの発現をサイトカインなどの添加により変化させられる可能性が示された。今後、シグレックの発現調節物質の検索により、こうした炎症を人為的に制御する方法を模索してゆきたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、財団法人三島海雲記念財団より学術研究奨励金のご支援を賜りました。心より御礼申しあげます。

文 献

- 1) P. R. Crocker et al.: *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 255-266, 2007.
- 2) M. Ando et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 878-883, 2008.
- 3) D. M. Mosser and J. P. Edwards: *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 958-969, 2008.