

食品機能成分によるマクロファージのフェノタイプ制御を介した肥満関連疾患の予防・治療戦略

藤原章雄

熊本大学大学院生命科学研究部 講師

緒言

マクロファージは体内の老廃物の処理や、微生物、ウイルスなどの病原体や腫瘍細胞に対する防御機能を担っており、感染症やガンなどの病態には、マクロファージの活性化が深く関わっている。その一方で、過剰なマクロファージの活性化は、逆に多くの病気の発症に関わることも知られている。近年、マクロファージの活性化機構には、古典的活性化経路とオルタナティブ活性化経路が存在することが明らかとなってきた¹⁾。すなわち、炎症惹起性に機能する古典活性化マクロファージ (M1マクロファージ) と、抗炎症性、組織修復性に機能するオルタナティブ活性化マクロファージ (M2マクロファージ) の2種類に大別される¹⁾。このようなマクロファージの活性化の違いは、様々な疾患の病態形成や消長と深く関連するため、マクロファージの活性化制御により、動脈硬化やメタボリックシンドローム、ガンなどの病態の予防や治療が可能であると考えられている。粥状動脈硬化症では、変性脂質を取り込み泡沫化したマクロファージが集積し壊死に陥ることで粥腫破綻がおり、心筋梗塞や脳梗塞などの急性期病変が惹起される。この粥状動脈硬化巣の形成には、炎症性機序が関わることが周知の事実であり、M1マクロファージが優位を占めている。また、肥満形成においても脂肪組織内のマクロファージが関与することが知られており、肥満脂肪内のマクロファージもM1優位であると報告されている。つまり、動脈硬化やメタボリックシンドローム病態では、マクロファージの活性化状態をM1からM2に転換できれば、M2マクロファージの抗炎症性作用を介した病態の改善が期待できる。そこで、本研究では、食品由来成分のマクロファージ活性化制御作用を評価し、マクロファージの活性化状態をM2へ変換することのできる食品由来成分を明らかにすることで、それら化合物の動脈硬化やメタボリックシンドロームに対する予防効果の検証を目的とした。

実験方法

Cell-ELISA

96wellプレートに播種したhuman monocyte-derived macrophages (HMDMs) に、IL-10存在下で試験化合物 (30 μ M) を添加し、24時間培養後、4% PFAにて固定した。ブロッキング後、1次抗体としてanti-human CD163 antibody (AM-3K) を、2次抗体としてHRP-goat anti-mouse IgG antibodyを使用することでCD163の発現を測定した。

サイトカインの測定

96wellプレートに播種したHMDMsに、ガン細胞の培養上清 (TCS) 存在下で試験化合物 (30 μ M) を添加し、24時間培養後、LPS含有培地 (100 mL/well) に置換した。さらに、24時間培養後、培養上清を回収し、培養上清中のIL-10、IL-12の濃度をELISA kit (eBioscience) にて測定した。

ウェスタンブロット法

HMDMsに試験化合物 (30 μ M) を添加し、24時間培養後に調製した細胞溶解液をSDS-PAGEにて分離後、PVDF膜に転写した。スキムミルクにてブロッキングを行った後、1次抗体 (anti-phospho-Stat3 antibody, anti-Stat3 antibody, anti- β -actin antibody) および、2次抗体 (HRP-goat anti-rabbit IgG antibody, HRP-goat anti-mouse IgG antibody) を使用し検出した。

脂肪細胞とマクロファージの共培養系におけるアディポネクチンの測定

試験化合物 (30 μ M) で24時間刺激したマウスマクロファージ細胞株 (RAW cell) をマウス3T3-L1脂肪細胞と24時間共培養し、培養上清中のアディポネクチン濃度をMouse Adiponectin ELISA kit (CycLex Co) にて測定した。

統計学的解析

グラフに示した数値は、すべて平均値±誤差で表記した。有意差検定はMann-Whitney *U*-testおよびNon-repeated measures ANOVAを行い、各群のデータが等分散であるとみなした場合、危険率が5%であるとき、統計学的に有意差ありと評価した。

結果

まず、保有する天然化合物（約200種類）を用いてマクロファージのM2活性化を促進する化合物のスクリーニングを行った。方法としては、ヒト単球由来マクロファージ（HMDMs）に天然化合物を添加し、M2マーカーであるCD163の発現を指標として評価した。その結果、Kakkalide, Stevioside, IsoquercetinおよびActheosideにCD163の発現誘導が認められた（図1）。

そこで次に、これら4つの化合物のマクロファージ活性化マーカーサイトカインであるIL-10（M2マーカー）および、IL-12（M1マーカー）の分泌に対する作用を評価した。その結果、すべての化合物は、M1マーカーであるIL-12の分泌には影響を与えなかったが、KakkalideおよびActheosideは、M2マーカーであるIL-10の分泌

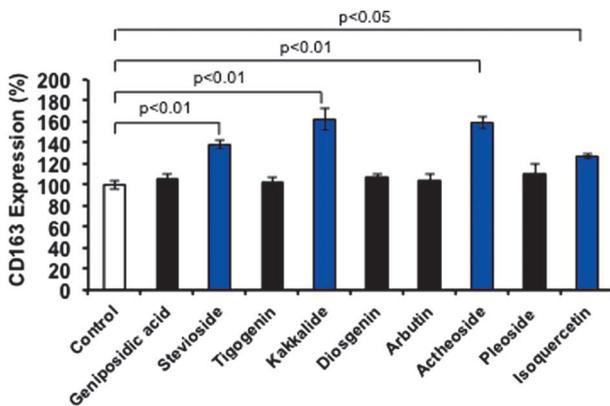


図1 CD163の発現を促進する化合物のスクリーニング

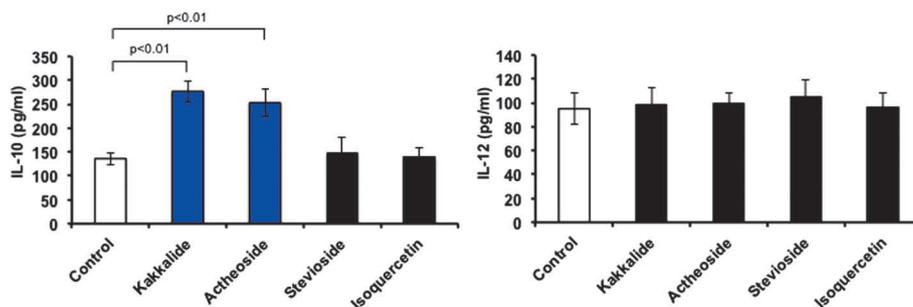


図2 マクロファージのIL-10およびIL-12の分泌に対する候補化合物の作用

を増加させた（図2）。ゆえに、KakkalideおよびActheosideはマクロファージの活性化をM2にシフトすることが示唆された。

次に、KakkalideならびにActheosideのマクロファージ活性化制御メカニズムを明らかにする目的で、それら化合物のマクロファージにおけるSTAT3の活性化に対する作用を検討した。近年、転写因子であるSTAT3の活性化は、マクロファージのM2活性化に深く関与していることが知られているため、STAT3を活性化することでマクロファージの活性化状態をM2に制御することが可能となる。結果を図3に示すが、KakkalideならびにActheosideは、マクロファージのSTAT3を活性化した。ゆえに、KakkalideならびにActheosideは、STAT3を活性化することでマクロファージのM2分化を促進することが示唆された。

脂肪組織浸潤マクロファージはインスリンの作用を阻害する炎症性サイトカインを産生し、肥満者における脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を阻害することで、炎症およびインスリン抵抗性に関与していることが知られている。したがって、化合物で刺激されたマクロファージが抗炎症性のM2マクロファージに誘導されれば、その抗炎症機能によって脂肪細胞からの善玉アディポサイトカインであるアディポネクチン分泌が改善されると考えられる。そこで、マクロファージのM2活性化を介したKakkalideおよびActheosideの脂肪細胞への効果を明らかにする目的で、これら化合物で刺激したRAW細胞（マウスマクロファージ細胞株）と3T3-L1脂肪細胞（マウス脂肪細胞）を共培養し、脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を評価した。その結果、アディポネクチン分泌は3T3-L1脂肪細胞の単独培養と比較して、RAW細胞との共培養によって有意に減少したのに対し、KakkalideならびにActheosideで刺激したRAW細胞との共培養では3T3-L1脂肪細胞からのアディポネク

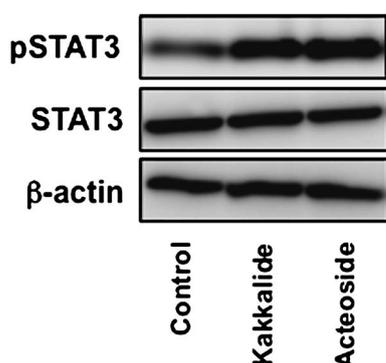


図3 マクロファージのSTAT3活性化に対する候補化合物の作用

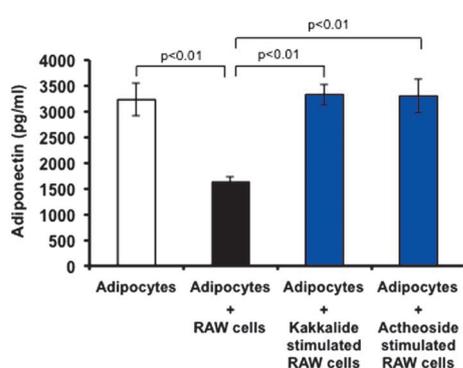


図4 マクロファージと脂肪細胞の共培養系における Adiponectin 分泌に対する候補化合物の作用

チン分泌が改善した (図4)。ゆえに、Kakkalide ならびに Acteoside はマクロファージの M2 活性化を介して脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を改善することが示唆された。

考 察

近年、マクロファージの活性化制御が病態の改善や治療に有効であると考えられている。例えば、マクロファージの M2 活性化抑制を介したガン治療という試みもなされており、最近、我々もマクロファージの M2 活性化を抑制 (M1 活性化への誘導) する Soyasapogenol や Corosolic acid、Onionin A といった天然化合物を同定し、これら化合物が動物モデルにおいて、マクロファージの活性化を制御することで、皮下腫瘍サイズの減少ならびに腫瘍の肺転移を抑制することを明らかにした²⁻⁶⁾。

本研究では、Kakkalide ならびに Acteoside の抗炎症性マクロファージである M2 マクロファージへの活性化誘導作用を検討した。これら化合物は、マクロファージの STAT3 を活性化することで M2 活性化を誘導するこ

とが明らかとなった。肥満は慢性炎症疾患であることが知られており⁷⁾、ヒトおよびマウスにおいて、体重増加とともに adipose tissue macrophages (ATMs) は脂肪組織に蓄積し、その数はインスリン抵抗性の指標と相関する。一方、体重減少に伴って ATMs の数および炎症性マーカーは共に減少する⁷⁾。また、ATMs は脂肪細胞のインスリン抵抗性をもたらす TNF- α 、IL-6 の脂肪組織における供給源である⁷⁾。健常状態において脂肪組織中の ATMs は M2 マクロファージのマーカーを発現するが、肥満における ATMs では M2 マーカーの発現は低下し、逆に M1 マクロファージに関連する遺伝子の発現が誘導されている⁷⁾。つまり、肥満では M1 マクロファージ優位であり、その脂肪組織に浸潤している M1 マクロファージが脂肪組織の炎症およびインスリン抵抗性を誘導することが知られている。したがって、脂肪組織中のマクロファージの活性化状態を M1 から M2 へシフトすることは、2 型糖尿病の新しい治療戦略となりうると思われる。本研究では Kakkalide ならびに Acteoside がマクロファージの分化・活性化状態を M2 へシフトすることを明らかにし、マクロファージを介した間接的な作用によって脂肪細胞の機能を改善することを明らかにした。

今後、Kakkalide ならびに Acteoside によるマクロファージの活性化制御メカニズムの詳細が明らかになることで、Kakkalide ならびに Acteoside といった化合物によるマクロファージの分化・活性化制御が、糖尿病、慢性炎症性疾患、心血管疾患、およびメタボリックシンドロームに対する新しい治療戦略の一つになると期待している。

要 約

本研究では、Kakkalide ならびに Acteoside が STAT3 を活性化し、マクロファージの活性化状態を抗炎症性の M2 タイプへシフトすることを明らかにした。また、これら化合物により M2 へシフトしたマクロファージが脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌を改善したことから、Kakkalide ならびに Acteoside はマクロファージの活性化制御を介した間接的作用により脂肪細胞機能を改善することが示唆された。ゆえに、Kakkalide ならびに Acteoside は、炎症性マクロファージが関与する慢性炎症疾患や心血管疾患に対して、マクロファージの活性化制御という新たなメカニズムでの治療戦略となりうる可能性が考えられた。

謝 辞

本研究を執行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝致します。また平成28年熊本地震に際しまして多くの皆様からお見舞いや励ましを頂きました。心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) S. Gordon, et al.: *Nat. Rev. Immuno.*, **3**, 23-35, 2003
- 2) Y. Fujiwara, et al.: *Can. Sci.*, **102**, 206-211, 2011
- 3) H. Horlad, et al.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**, 1046-1054, 2013
- 4) Y. Fujiwara, et al.: *J. Func. Foods*, **19**, 594-605, 2015
- 5) T. Junko, et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 29588, 2016
- 6) Y. Fujiwara, et al.: *Mol. Nutr. Food Res.*, in press
- 7) C. N. Lumeng, et al.: *J. Clin. Invest.*, **117**, 175-184, 2015
- 8) K. Kadowaki, et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 5090-5094, 2006