

トピック

中枢神経系を介するレプチンの炎症・免疫調節作用

田中 都^{*1}, 菅波 孝祥^{*1}, 小川 佳宏^{*1,2}

^{*1}東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野

^{*2}東京医科歯科大学グローバルCOEプログラム

はじめに

近年、脂肪組織は、アディポサイトカインと呼ばれる多くの生理活性物質を産生する生体内の重要な内分泌器官と考えられている^{1,2)}。レプチンは、代表的なアディポサイトカインであり、視床下部に直接作用し、主にメラノコルチン系を介して摂食量やエネルギー消費を調節する³⁻⁶⁾。一方、レプチン受容体Ob-Rbは、炎症性サイトカインのシグナル伝達分子であるgp130と高い相同性を有しており、視床下部のみならず、腎やマクロファージなどの末梢組織にも発現することが知られている⁷⁾。このため、レプチンは炎症性サイトカインとして末梢組織に作用する可能性がある。例えば、遺伝的にレプチンを欠損する*ob/ob*マウスあるいはOb-Rbに変異を有する*db/db*マウスでは、肝障害モデルや血管障害モデルにおいて抵抗性を示すことが報告されており、レプチンは炎症促進作用を有する可能性がある^{8,9)}。

UUO (unilateral ureteral obstruction) は、一側尿管結紮による腎間質障害モデルとして広く使用されている実験系であり、腎障害進展の分子機構が詳細

に解析されている¹⁰⁾。すなわち、UUOにより腎尿細管上皮細胞から種々のケモカインが産生され、マクロファージ浸潤が亢進し、浸潤マクロファージは腎線維化へと至る腎障害の進展に大きく関与する。本研究では、UUOを用いて、腎マクロファージ浸潤に着目して、レプチンの炎症性サイトカインとしての作用およびその分子機構を検討した。

1. レプチンシグナル欠損マウスと腎マクロファージ浸潤

8週齢雄性野生型マウスおよび*ob/ob*マウスにUUOを施行し、腎尿細管間質障害モデルを作製した。3~14日後に腎障害を遺伝子発現、組織学的評価により評価したところ、野生型マウスのUUO腎では、サイトカイン、マクロファージマーカーの遺伝子発現が経時的に上昇したが、*ob/ob*マウスではその上昇が有意に抑制された。さらに、組織学的評価によりマクロファージ(F4/80陽性細胞)浸潤の抑制を確認した(図1)。*db/db*マウスにおいても同様のサイトカイン遺伝子発現、マクロファージ浸潤の抑制が認められた。以上より、レプチンシグナルの欠損により、腎マクロファージ浸潤が軽減す

ることが明らかとなった。

2. 末梢レプチンシグナルおよび食餌制限と腎マクロファージ浸潤

次に、*ob/ob*マウスで認められた腎マクロファージ浸潤の低下が、レプチンの補充によって解除されるかどうか検討する目的で、浸透圧ミニポンプを用いて*ob/ob*マウスにレプチンを持続皮下投与しながらUUOを施行した。レプチン投与*ob/ob*マウスは投与開始時より経時的に体重が減少し、解剖時には、PBS(phosphate-buffered saline)投与対照*ob/ob*マウスと比較して、血糖値の有意な低下、血中レプチン濃度の有意な上昇が認められた。この時、対照*ob/ob*マウスで認められたUUOによる腎マクロファージ浸潤抑制効果は消失した。レプチン投与*ob/ob*マウスは著しい体重減少をとまなうため、体重を野生型マウスと同レベルに保つよう、4週齢より食餌制限を行った*ob/ob*マウスにUUOを施行した。その結果、食餌制限*ob/ob*マウスは、対照自由摂食*ob/ob*マウスに比較して、解剖時に血糖値の有意な低下が認められたが、UUOによる腎マクロファージ浸潤には差が認められなかった。

Ob-Rbは、マクロファージやその起源となる骨髓細胞に発現していることが知られている。そこで、それらに対するレプチンの直接作用を検討する目的で、培養尿細管上皮細胞やマクロファージ細胞にレプチンを添加したところ、炎症性変化は認められなかった。また、個体レベルで検討する目的で、骨髓移植法により骨髓細胞特異的Ob-

Role of Central Leptin Signaling in Peripheral Inflammation and Immune Response

Miyako TANAKA^{*1}, Takayoshi SUGANAMI^{*1}, Yoshihiro OGAWA^{*1,2}

^{*1}Department of Molecular Medicine and Metabolism, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

^{*2}Global Center of Excellence Program, Tokyo Medical and Dental University

Rb変異マウスを作製し、UUOを施行した。その結果、骨髄細胞特異的Ob-Rb変異マウスでは、対照マウスと比較して、体重、血糖値に差は認められず、UUOによる腎マクロファージ浸潤にも差は認められなかった。以上より、レプチンは体重変化とは無関係に腎マクロファージ浸潤を増加させること、腎マクロファージ浸潤に骨髄細胞のOb-Rbの関与は少ないことが考えられた。

3. 中枢レプチンシグナルと腎マクロファージ浸潤

摂食やエネルギー代謝調節などレプチンの主要な生理作用は、中枢神経系のOb-Rbを介するため、レプチンが中枢神経系を介して腎マクロファージ浸潤を調節する可能性を検討する目的で、*ob/ob*マウスにレプチンを持続脳室内投与しながらUUOを施行した。レプチン投与*ob/ob*マウスは投与開始時より経時的に体重が減少し、解剖時には、人工脳脊髄液(artificial cerebrospinal fluid: aCSF)を投与した対照*ob/ob*マウスと比較して、血糖値の有意な低下が認められた。血中レプチン濃度には差が認められなかった。この時、対照*ob/ob*マウスで認められたUUOによる腎マクロファージ浸潤抑制効果は消失した。

さらに、レプチンの摂食・エネルギー代謝調節に関与するメラノコルチン系がUUOによる腎マクロファージ浸潤に及ぼす影響を検討する目的で、レプチンとメラノコルチン3型・4型受容体(MC3R, MC4R)のアンタゴニストSHU9119を脳室内に同時投与した*ob/ob*マウスにUUOを施行した。その結果、レプチン単独投与*ob/ob*マウスでは、aCSF投与対照*ob/ob*マウスと比較して、体重、血糖値の有意な低下、直腸温の有意な上昇が認められたが、

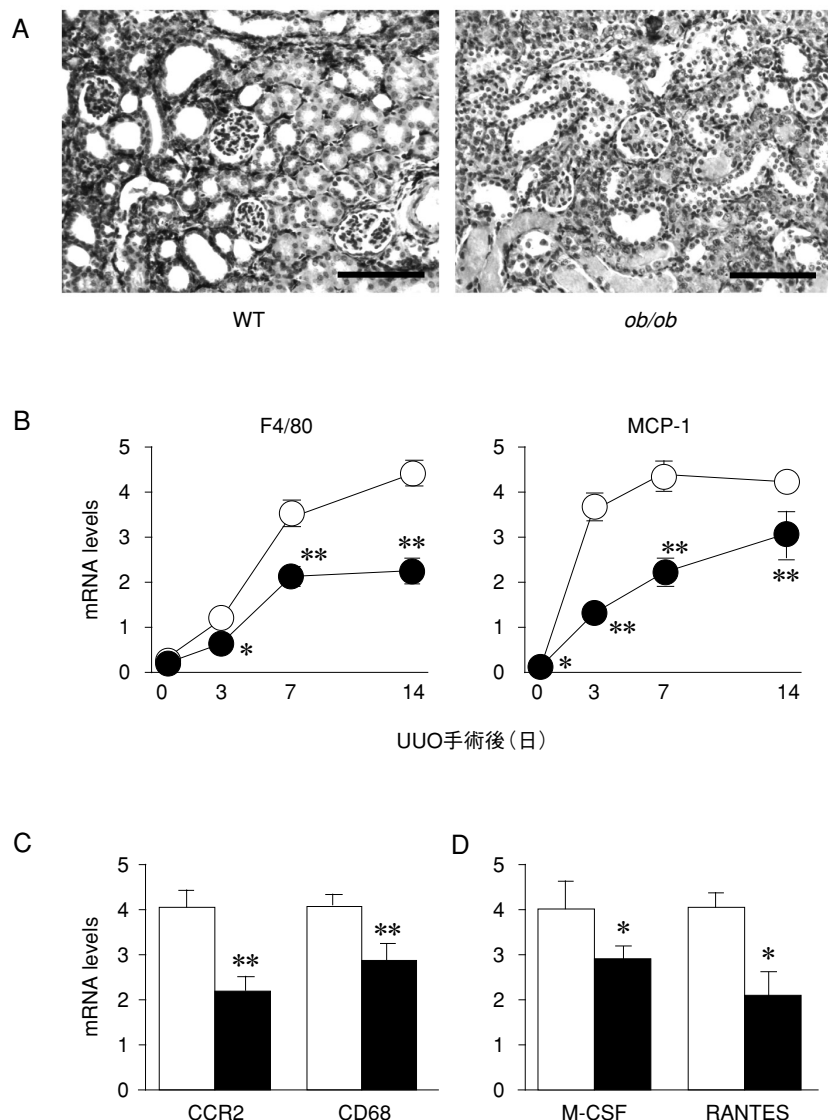


図1 レプチンシグナル欠損と腎マクロファージ浸潤

A: UUO14日目の野生型(WT)マウスおよび*ob/ob*マウスの腎F4/80(マクロファージ)染色。*ob/ob*マウスでは、WTマウスと比較して、マクロファージ浸潤が著明に減少する。

B: WTマウス(白)および*ob/ob*マウス(黒)のUUO腎におけるF4/80およびMCP-1遺伝子発現の経時変化。*ob/ob*マウスでは、WTマウスと比較して、UUOによる遺伝子発現上昇が抑制される。

C, D: WTマウス(白)および*ob/ob*マウス(黒)のUUO腎におけるマクロファージマーカー遺伝子発現(14日目)、ケモカイン遺伝子発現(7日目)。*ob/ob*マウスでは、WTマウスと比較して、UUOによる遺伝子発現上昇が抑制される。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT, $n = 5-7$

SHU9119の同時投与でその効果は消失した。この時、レプチン単独投与*ob/ob*マウスで認められた腎マクロファージ浸潤の増加は、SHU9119の同時投与で抑制された(図2)。以上より、レプチンは中枢神経系、主にメラノコ

ルチン系を介して腎マクロファージ浸潤を調節することが明らかになった。

4. 中枢レプチンシグナルと骨髄細胞

腎マクロファージ浸潤に及ぼす中枢

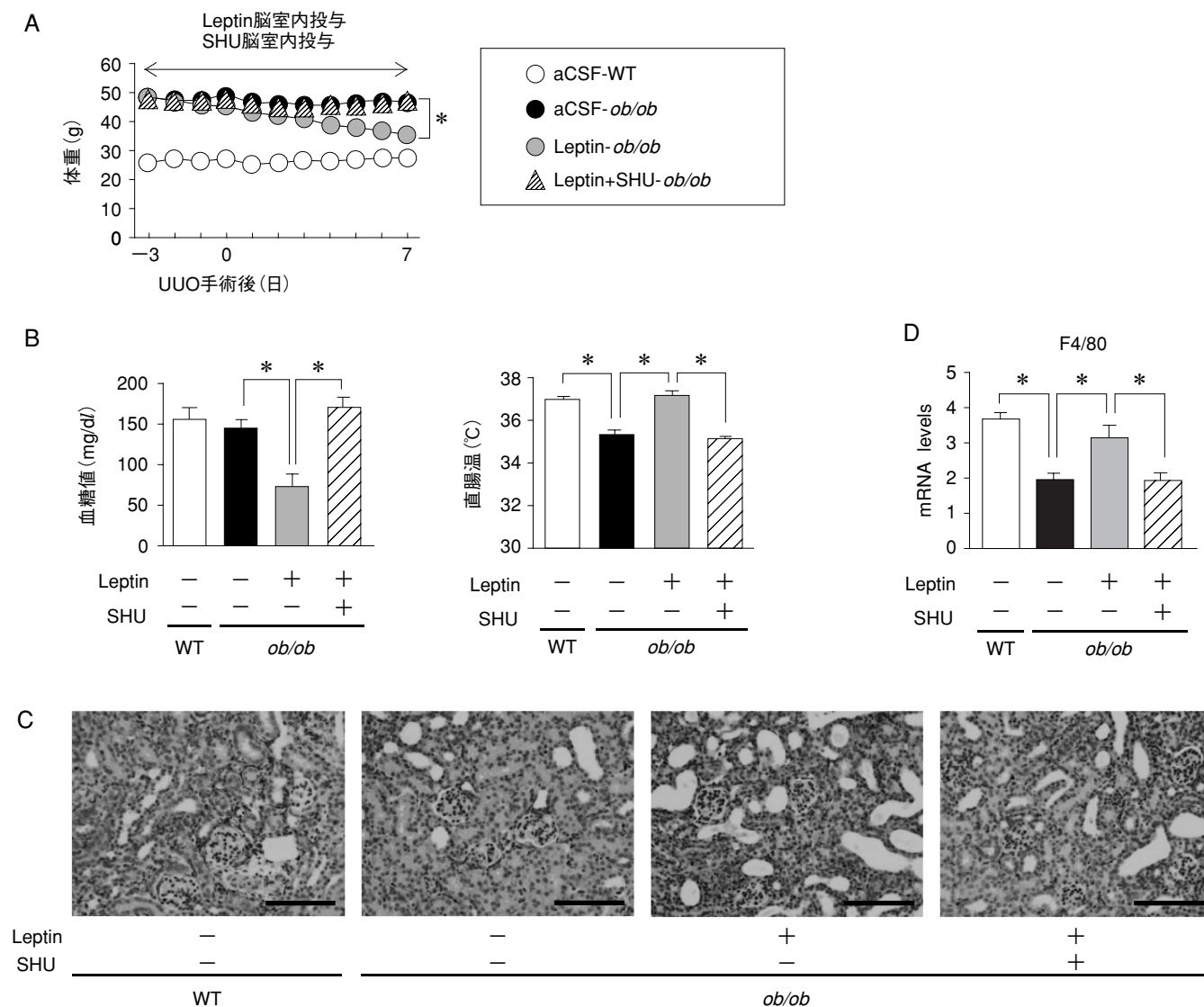


図2 中枢レプチンシグナルと腎マクロファージ浸潤

A: 実験期間中の体重変化。レプチン脳室内投与による*ob/ob*マウスの体重減少は、SHU9119の同時投与で遮断される。

B: 解剖時の血糖値および直腸温。レプチン脳室内投与による*ob/ob*マウスの血糖値の低下、直腸温の上昇は、SHU9119の同時投与で遮断される。

C, D: UUO 7日目の腎マクロファージ染色およびマクロファージマーカー遺伝子発現。*ob/ob*マウスで認められる腎マクロファージ浸潤の減少は、レプチン脳室内投与により解除され、その効果はSHU9119の同時投与で遮断される。

* $p < 0.05$, $n = 6-8$

レプチンシグナルの作用点を調べる目的で、レプチン脳室内投与*ob/ob*マウスの骨髓細胞をFACS解析した。レプチン投与*ob/ob*マウスでは、aCSF投与対照*ob/ob*マウスに比較して、骨髓単球系細胞の割合は変化しなかったが、走化性因子fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) 含有マトリゲルを皮下に留置し、浸潤細胞数を評価する*in vivo* matrigel plug chemotaxis

assayでは、マトリゲルへの単位面積当たりのマクロファージ浸潤数が有意に増加した。以上より、レプチンは中枢神経系を介して、骨髓細胞の質的変化をもたらすことが明らかとなった。

おわりに

本研究は、これまでに知られているレプチンの炎症促進作用が中枢神経系を介することを初めて明らかにした。

中枢レプチンシグナルについては、摂食・エネルギー代謝調節に関する多くの知見があり、メラノコルチン系を介することが報告されている。本研究では、レプチンとMC3R/4RアンタゴニストSHU9119を*ob/ob*マウスの脳室内に同時投与すると、レプチンによる腎マクロファージ浸潤促進効果が抑制された。これまでに、MC3R欠損マウスおよびMC4R欠損マウスを用いた検討

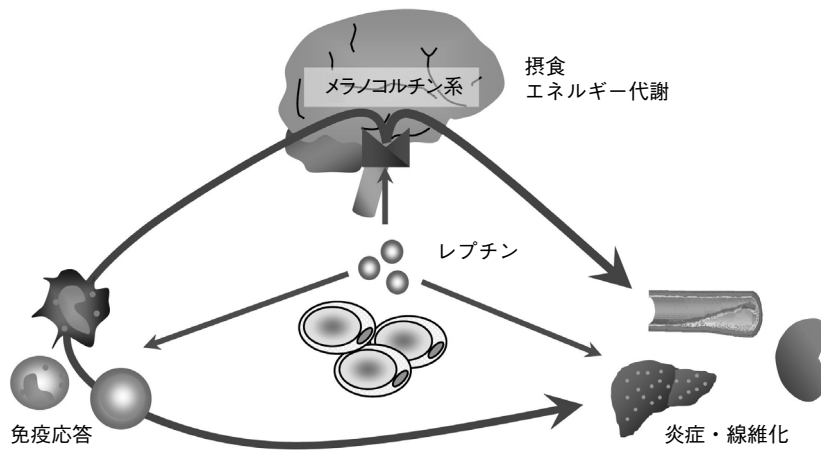


図3 中枢神経系を介したレプチンの炎症・免疫調節作用

視床下部において摂食・エネルギー代謝シグナルに中心的な役割を果たすレプチン-メラノコルチン系が、末梢組織の炎症や免疫機能を制御する可能性がある。

で、肥満脂肪組織へのマクロファージ浸潤がMC3R欠損マウスにおいてのみ抑制されることが報告されている¹¹⁾。MC3R, MC4Rはレプチンシグナル下流において、前者は末梢の炎症調節、後者は摂食・エネルギー代謝調節にそれぞれ関与する可能性が考えられる。また、本研究では、レプチン脳室内投与 ob/ob マウスにおいて、単球走化性の亢進が認められたため、レプチン脳室内投与 ob/ob マウスにおいて認められたUUOによる腎マクロファージ浸潤の促進の少なくとも一部は、レプチンが中枢神経系を介して単球の走化性を亢進することによると考えられた。実際、骨髓細胞特異的Ob-Rb変異マウスでは対照マウスと比較して、UUOによる腎マクロファージ浸潤の程度に差を認めなかったことより、レプチンが骨髓細胞に直接作用して単球機能調節を行う可能性は低いと考えられた。さらに、レプチン脳室内投与により、

ob/ob マウスで認められる骨髓B細胞分化異常が改善することを予備的に見出し、骨髓細胞の分化や機能調節に中枢レプチンシグナルが重要な役割を担うことが考えられた。以上より、個体の食欲やエネルギー代謝のみならず全身の炎症あるいは免疫機能が中枢神経系により制御されている可能性が示唆された¹²⁾(図3)。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご協力いただきました諸先生方に、心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Tilg H, Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**: 772-783.
- 2) Flier JS: Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004, **116**: 337-350.

- 3) Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, et al.: Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 1997, **390**: 349.
- 4) Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, et al.: Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neurosci Lett* 1998, **249**: 107-110.
- 5) Friedman JM, Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998, **395**: 763-770.
- 6) Ogawa Y, Masuzaki H, Hosoda K, et al.: Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes* 1999, **48**: 1822-1829.
- 7) Fei H, Okano HJ, Li C, et al.: Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**: 7001-7005.
- 8) Honda H, Ikejima K, Hirose M, et al.: Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002, **36**: 12-21.
- 9) Stephenson K, Tunstead J, Tsai A, et al.: Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**: 2027-2033.
- 10) Chevalier RL: Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006, **2**: 157-168.
- 11) Ellacott KL, Murphy JG, Marks DL, et al.: Obesity-induced inflammation in white adipose tissue is attenuated by loss of melanocortin-3 receptor signaling. *Endocrinology* 2007, **148**: 6186-6194.
- 12) Tanaka M, Suganami T, Sugita S, et al.: Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration. *Endocr J* 2010, **57**: 61-72.

*本論文の内容は2009年度日本肥満学会若手研究者奨励賞(YIA)の受賞対象となったものである。