

加齢による皮下脂肪萎縮の分子基盤の解明

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学環境医学研究所

菅波 孝祥

Although its role as an endocrine organ that produces adipokines (adipose tissue-derived hormones) has been the focus of recent attention, the primary function of adipose tissue is to store excessive energy as triglyceride. Thus, its functional failure leads to ectopic lipid accumulation in non-adipose tissue, thereby causing abnormal systemic glucose metabolism. In this regard, Japanese people are characterized by a body fat distribution that is low in subcutaneous adipose tissue and relatively high in ectopic fat, and they have the same risk of diabetes as Western people despite having a lower body mass index (BMI) than Western people. In the elderly, subcutaneous adipose tissue becomes atrophic and fibrotic, which is not only a cosmetic feature of aging, but is also closely related to the excessive accumulation of ectopic fat and the pathogenesis of various aging-related diseases. In this study, we focused on atrophy of subcutaneous adipose tissue and identified gene expression changes common to atrophy of subcutaneous adipose tissue through RNA-seq analysis of aged mice and a Cachexia model. For the next step, we would like to further investigate the molecular mechanism and develop a new method to improve metabolism by preventing and improving atrophy of subcutaneous adipose tissue.

1. 緒言

アディポカイン研究の進捗により、内分泌器官としての脂肪組織の意義が明らかになり、メタボリックシンドロームの病態メカニズムの理解は急速に進んだ。一方、余剰エネルギーを中性脂肪として蓄積することは脂肪組織の一義的な機能であり、その許容量をオーバーすると肝臓や骨格筋などに異所性に蓄積され、全身の糖代謝異常につながる。例えば日本人は、皮下脂肪が少なく、異所性脂肪が相対的に多いという体脂肪分布の特徴があるため、欧米人よりもBMI (body mass index) が低いにもかかわらず、欧米人と同等の糖尿病リスクを有している。また、高齢者に多く認められる“隠れ肥満”では、皮下脂肪組織の萎縮や骨格筋量の減少により体重は正常範囲にとどまるが、内臓脂肪や異所性脂肪が過剰に蓄積する。このように皮下脂肪組織は、余剰のエネルギーを安全に蓄積するメタボリックシンクとしての役割を果たす。さらに、加齢に伴う皮下脂肪組織の萎縮は、皮膚の創傷治癒力や局所免疫力の低下にもつながる。しかしながら、加齢による皮下脂肪組織の機能破綻に関しては、ほとんど注意が払われてこなかった。

研究代表者は、過栄養が脂肪組織に慢性炎症を惹起し、アディポカイン産生調節や脂肪蓄積能の破綻によりメタボリックシンドロームを発症する分子メカニズムの解明に取り組んできた。特に、マクロファージが脂肪細胞と相互作用

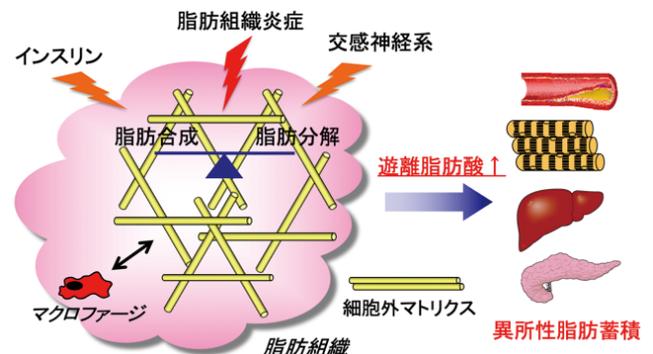


図1 脂肪組織炎症と異所性脂肪蓄積

用して炎症慢性化に働き、脂肪組織の線維化を誘導することを見出した^{1,2)}。その結果、内臓脂肪組織の脂肪蓄積能が障害され、肝臓に異所性に蓄積することで、インスリン抵抗性が増悪する(図1)。これにより、脂肪組織に余剰エネルギーを蓄えることが全身の代謝を良好にコントロールするという概念“adipose tissue healthy expansion”の分子機構の一端を明らかにした。一方、海外の臨床研究によると、内臓脂肪組織と同様に皮下脂肪組織においても線維化が生じ、その線維化の程度は脂肪肝や糖代謝異常と正の相関を示すという³⁾。即ち、皮下脂肪組織の萎縮や線維化は、単に老化の外観の特徴のみならず、老化関連疾患の病態形成にも密接に関わると想定される(図2)。そこで本研究では、マウスモデルを用いて加齢に伴う皮下脂肪萎縮の分子メカニズムの解明を目指す。

2. 方法

2.1. マウス

マウスは雄性C57BL/6J系統を日本クレアから購入した。名古屋大学東山動物実験施設、および名古屋大学環境



Molecular mechanism underlying age-associated adipose tissue atrophy

Takayoshi Suganami

Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

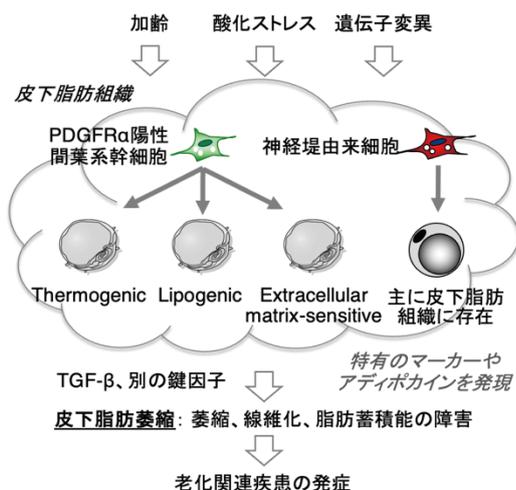


図2 皮下脂肪細胞の多様性と加齢による変化

医学研究所特別実験棟において適切な温湿度管理の下で飼育し、若齢マウスとして10週齢、加齢マウスとして1年齢の個体を使用した。皮下脂肪組織として鼠径部皮下脂肪組織、内臓脂肪組織として副睾丸周囲脂肪組織をサンプリングし、RNA-seq解析に加えて組織学的解析などに供した。

2.2. RNA-seq解析

定法に従って脂肪組織からtotal RNAを抽出し、RNA-seq解析に供した⁴⁾。シークエンスは、名古屋大学環境医学研究所発生・遺伝分野の荻朋男博士のサポートを得て実施した。シークエンス結果をiDEP.96、およびIPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いて解析した。

2.3. 脂肪組織間質細胞の調整

定法に従って、トリミングした脂肪組織をコラゲナーゼで処理し、遠心処理にて浮遊する成熟脂肪細胞と沈降する間質細胞に分離した。浮遊細胞を廃棄し、沈降した細胞を回収することで間質細胞分画を調整した^{1,2)}。

2.4. カヘキシアモデルの作製

腎不全カヘキシアのモデルとして、5/6腎摘モデルを作製した。片側腎を2/3摘出し、回復後に対側腎を全摘することで、5/6腎重全摘とした。モデル作製後、16週間経過を観察し、サンプリングを行った。片側腎のみを摘出した1/2腎摘マウスを対照群とした。

3. 結果

3.1. 加齢マウスの脂肪組織に関する解析

マウスは雄性のC57BL/6J系統を用いて、若齢マウスとして10週齢、加齢マウスとして1年齢を使用した。皮下脂肪組織として鼠径部皮下脂肪組織、内臓脂肪組織として副睾丸周囲脂肪組織をサンプリングした。組織学的な解析により、いずれの脂肪組織においても加齢マウスで細胞密度が低下することを確認し、RNA-seq解析に供した。

RNA-seq解析では、加齢に伴って脂肪組織部位特異的に発現が2倍以上増減する遺伝子群に着目した。例えば、加齢に伴って発現が増加する遺伝子は、皮下脂肪組織では1,073個、内臓脂肪組織では631個、共通して増加する遺伝子は170個であった(図3)。このうち、内臓脂肪組織において特異的に発現が増加する遺伝子群として、既に知

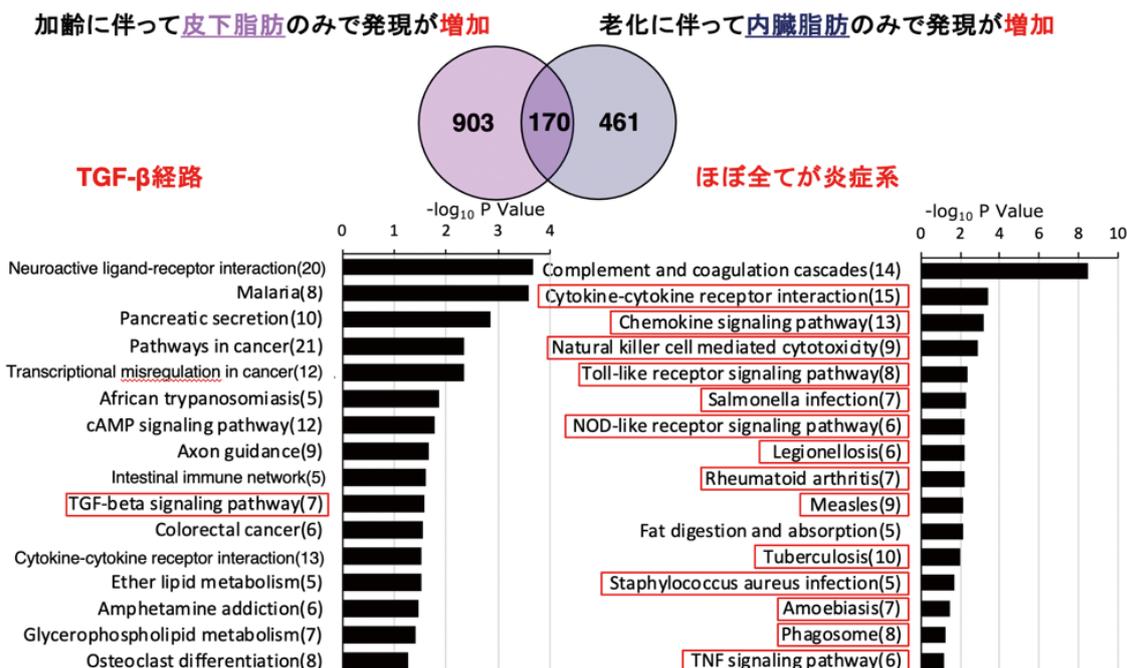


図3 加齢に伴って脂肪組織部位別に発現が増加する遺伝子群

られているように、炎症性サイトカインやケモカインなど炎症関連遺伝子群が上位を占めた。これに対して、皮下脂肪組織において特異的に発現が増加する遺伝子群としては、TGF- β (Transforming Growth Factor- β) シグナルが抽出された。より詳細に解析すると、TGF- β スーパーファミリーのうち、脂肪細胞分化を抑制するTGF- β 経路は発現低下し、これに対して脂肪細胞分化を促進するBMP (Bone Morphogenetic Protein) 経路が発現上昇していた。

一方、加齢に伴って発現が減少する遺伝子は、皮下脂肪組織では758個、内臓脂肪組織では1,323個、共通して減少する遺伝子は62個であった(図4)。皮下脂肪組織において特異的に発現が減少する遺伝子群としては、脂肪細胞分化のマスター制御因子であるPPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ)-C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Proteins) 経路が抽出され、加齢に伴う皮下脂肪萎縮と合致する所見であった。この分子機序として、炎症の関与を想定している。即ち、内臓脂肪組織と比べて軽度ではあるが、加齢に伴って皮下脂肪組織においてもTNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) など炎症性サイトカインの発現が上昇し、これがPPAR γ -C/EBP経路を抑制すると考えられる。

3.2. 脂肪組織由来間質細胞の加齢変化

すべての臓器は、その臓器を特徴付ける実質細胞とそれ以外の多彩な間質細胞から構成され、脂肪組織も例外ではない。実質細胞である成熟脂肪細胞は、余剰エネルギーを

中性脂肪として蓄える巨大な脂肪滴を有し、生体のエネルギー状態に応じて中性脂肪を蓄積、あるいは分解することで自身のサイズをダイナミックに変化させる⁵⁾。間質細胞には、免疫細胞、血管構成細胞、成熟脂肪細胞に分化する前駆脂肪細胞などが含まれ、脂肪組織に含まれる細胞数の約1/3を占めるという⁶⁾。例えば、持続的な過栄養は成熟脂肪細胞のサイズを増大(肥大化)させるのみならず、種々の免疫細胞の浸潤、血管新生、細胞外マトリクスの蓄積などダイナミックな組織学的変化をもたらす、脂肪組織全体の機能が変容する。一方、加齢が脂肪組織の間質細胞に及ぼす影響は、未だ不明の点が多い。

そこで、若齢、および加齢マウスの皮下脂肪組織から間質細胞を調整し、RNA-seq解析を行った。その結果、臓器全体の解析結果(3.1.)と同様に、PPAR γ -C/EBP経路の強力な発現低下が観察された一方、TGF- β 、およびBMP経路は発現が低下していた。以上より、前駆脂肪細胞を含む間質細胞において、TGF- β やBMPではなく、炎症に伴うPPAR γ -C/EBP経路の抑制が成熟脂肪細胞密度の低下、ひいては皮下脂肪組織の萎縮をもたらす可能性が高い。

3.3. カヘキシアモデルにおける脂肪萎縮

加齢に加えて、がん、心不全、腎不全など消耗性疾患に伴う悪液質(カヘキシア)においても脂肪組織の萎縮が認められ、栄養状態の不良が疾患予後にも悪影響を及ぼす。そこで5/6腎摘による腎不全モデルをマウスに作製し、

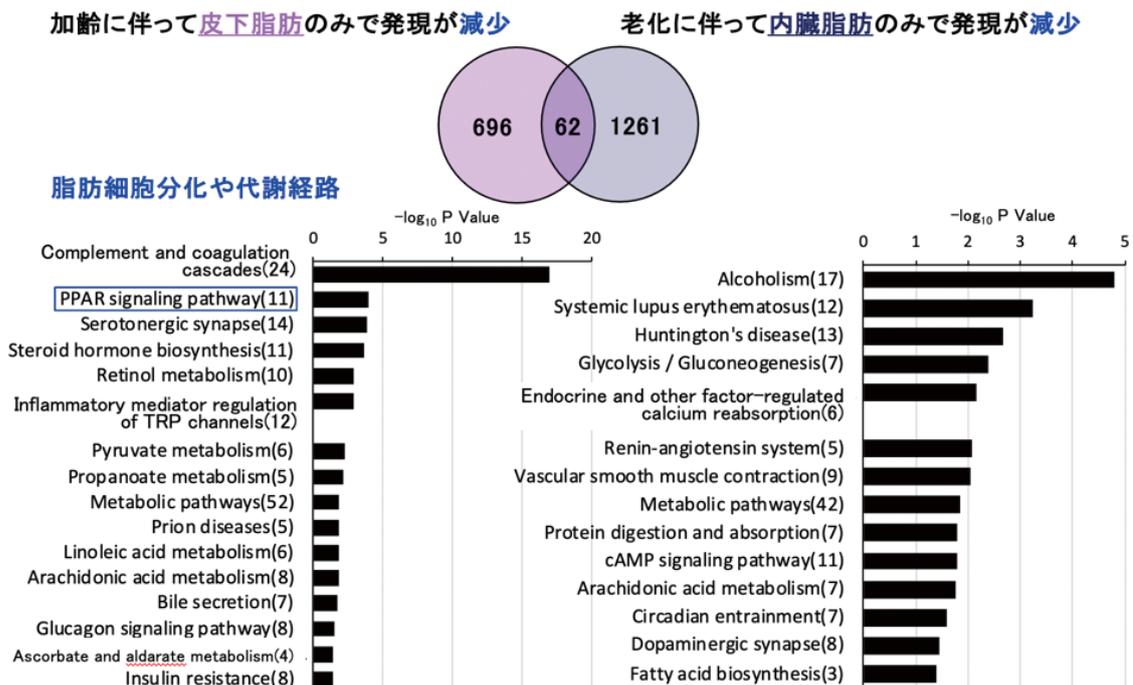


図4 加齢に伴って脂肪組織部位別に発現が減少する遺伝子群

脂肪組織の変化を検討した。16週間の腎不全状態により、皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の重量は、それぞれ対照群の1/2以下まで顕著に減少した。RNA-seq解析を行ったところ、両者は同様に萎縮したにもかかわらず、遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていた。皮下脂肪組織では、TNF- α など炎症性サイトカイン発現の上昇とPPAR γ 発現の低下が認められ、加齢による脂肪組織萎縮と同様の傾向を確認した。

4. 考察および総括

これまで肥満やメタボリックシンドロームの増加が注目され、過栄養がどのようにして慢性炎症を惹起し、全身の代謝異常や臓器合併症につながるかが精力的に研究されてきた。皮下脂肪組織に関しては、近年、エネルギー消費を司るベージュ脂肪細胞の分化機構が注目されており、新しい抗肥満治療への応用が期待されている。一方、高齢者では、骨格筋の質や量の低下(サルコペニア)が指摘され、body mass indexの高い方がむしろ生命予後が良いことも知られている。また、加齢とともに進行する皮下脂肪組織の萎縮は、代謝柔軟性(Metabolic flexibility)の低下や“隠れ肥満”の要因と想定されるが、その分子機序はほとんど分かっていない。本研究では、加齢マウスの皮下脂肪組織と内臓脂肪組織を比較することにより、皮下脂肪組織の萎縮に特徴的な遺伝子群の同定を試みた。その結果、脂肪細胞分化のマスター制御因子であるPPAR γ 経路が抑制されること、その機序として、TNF α など炎症性サイトカインの発現上昇が認められることを見出した。

皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の違いは広く認識されているが、この違いが何によって規定されているかは、未だ不明の部分が多い。例えば、皮下脂肪組織は体循環の血液が灌流するのに対して、内臓脂肪組織は門脈血が灌流する。門脈血には、消化管から吸収された高濃度の栄養素やエンドトキシン、種々のホルモン・サイトカインが含まれるため、内臓脂肪組織選択的に慢性炎症が生じると想定される。実際、ヌードマウスの皮下や腹腔内に脂肪細胞株を移植した検討では、腹腔内に移植した脂肪細胞株がより強い炎症反応を呈したという。これに対して、腹腔内に皮下脂肪組織を移植したマウスでは全身の糖代謝が改善するという報告もあり、皮下脂肪組織と内臓脂肪組織は細胞起源が全く異なる可能性も提唱されている。実際、寒冷刺激や交感神経系の活性化でベージュ脂肪細胞が誘導されるのは主に皮下脂肪組織であり、皮下脂肪組織と内臓脂肪組織に含まれる脂肪幹細胞の違いが示唆される。過栄養による慢性炎症は主に内臓脂肪組織に生じることが知られているが、今回、加齢に伴う慢性炎症はむしろ皮下脂肪組織に顕著に認められた点が興味深い。TNF α は、皮下脂肪組織の間質細胞においても上昇していたため、今後、多様な間質細胞のうち、

どの細胞が加齢に伴ってTNF α を産生するのかを明らかにする必要がある。

全身の栄養状態が低下する病態としては、加齢に加えて、カヘキシアが注目されている。これは単なる栄養不足の状態ではなく、通常の栄養サポートでは完全に回復せず、進行性に予後を増悪させる点で臨床的な課題となっている。この機序として、がんや心不全、腎不全などに伴う全身の慢性炎症状態が指摘されており、脂肪組織が萎縮する。最近、がんカヘキシアに対しては、食欲亢進作用を有するグレリン受容体アナログが臨床応用され、栄養状態の改善や骨格筋量の増加が期待されているが、対象症例に限られるなど十分な知見は得られていない。本研究では、腎不全カヘキシアモデルを用いて解析した結果、皮下脂肪組織の萎縮に関して、加齢と同様にTNF- α の発現亢進とPPAR γ の発現抑制を認めた。種々の皮下脂肪組織の萎縮に共通する病態基盤として、この分子機序をさらに解明することで、複数の疾患において新たな栄養・代謝改善法の開発につながることを期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり貴重なご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun.* 2014; 9(5): 4982. doi: 10.1038/ncomms5982. PMID: 25236782.
- 2) Ichioka M, Suganami T, Tsuda N, Shirakawa I, Hirata Y, Satoh-Asahara N, Shimoda Y, Tanaka M, Kim-Saijo M, Miyamoto Y, Kamei Y, Sata M, Ogawa Y. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. *Diabetes.* 2011; 60(3): 819-826. doi: 10.2337/db10-0864. PMID: 21282371.
- 3) Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clément K. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes.* 2010; 59(11): 2817-25. doi: 10.2337/db10-0585.
- 4) Itoh M, Tamura A, Kanai S, Tanaka M, Kanamori Y, Shirakawa I, Ito A, Oka Y, Hidaka I, Takami T, Honda Y, Maeda M, Saito Y, Murata Y, Matozaki T,

- Nakajima A, Kataoka Y, Ogi T, Ogawa Y, Suganami T. Lysosomal cholesterol overload in macrophages promotes liver fibrosis in a mouse model of NASH. *J Exp Med*. 2023; 220(11): e20220681. doi: 10.1084/jem.20220681.
- 5) Suganami T, Tanaka M, Ogawa Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocr J*. 2012; 59: 849-57. doi: 10.1507/endocrj.ej12-0271.
- 6) Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010; 88: 33-9. doi: 10.1189/jlb.0210072.