アポトーシス抑制因子 AIM を基盤とした
メタボリックシンドローム病態形成機構の解明

黒川　淳

【目次】

【略語一覧】

AIM : apoptosis inhibitor of macrophage

ACP : acyl carrier protein

AMPK : 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase

Api6 : apoptosis inhibitor 6

ATGL : adipose triglyceride lipase

BSA : bovine serum albumin

cAMP : Cyclic adenosine monophosphate

CC : central core

CCL-2 : Chemokine (C-C motif) ligand 2

CCL-5 : Chemokine (C-C motif) ligand 5

CCR-2 : chemokine (C-C motif) receptor-2

CD4 : cluster of differentiation 4

CD5L : cluster of differentiation 5 antigen like

CD8 : cluster of differentiation 8

CD11c : cluster of differentiation 11c

CD36 : cluster of differentiation 36

CD95L : cluster of differentiation 95 ligand

CD163 : cluster of differentiation 163

C/EBPα : CCAAT-enhancer-binding protein α

c-JNK : c-Jun N-terminal kinase

CLS : crown-like structure

CM : conditioned medium

co-IP : co-immunoprecipitation

DEX : dexamethasone

DH : dehydrase

EEA1 : Early Endosome Antigen 1

EGF : epidermal growth factor

ER : enoylreductase

ERAD : endoplasmic reticulum-associated degradation

FAS (FASN) : fatty acid synthase

FFA : free fatty acid

FGF-1 : fibroblast growth factor-1

FGF-2 : fibroblast growth factor-2

Fsp27 : fat-specific protein of 27 kDa

Glut4 : glucose transporter type 4

GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta

GTT : glucose tolerance test

HEK293T : human embryonic kidney cell line 293T

HFD : high fat diet

HSL : hormone-sensitive lipase

Hsp90 : heat-shock protein 90

IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine

IFNγ : interferon-γ

IκBα : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

IgM : Immunoglobulin M

IgG : Immunoglobulin G

IL-1β : interleukin-1β

IL1R : interleukin-1 receptor

IL-6 : interleukin-6

IL-10 : interleukin-10

IL-18 : interleukin-18

IP-MS : immunoprecipitation-mass spectrometry

IRF3 : interferon regulatory factor 3

IRS1 : insulin receptor substrate 1

ITT : insulin tolerance test

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KR : ketoreductase

KS : ketoacyl synthase

LAL : lysosomal acid lipase

LDL : low density lipoprotein

LPS : lipopolysaccharide

LTA : lipoteichoic acid

LXR : liver X receptor

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MAT : malonyl / acetyl transferase

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MCP-2 : monocyte chemoattractant protein-2

MCP-3 : monocyte chemoattractant protein-3

NCEP-ATP Ⅲ : National Cholesterol Education Program’s Adults Treatment Panel Ⅲ

NKT : natural killer T

NFκB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLRP3 : NOD-, LRP- and pyrin domain containing 3

NOS : nitric oxide synthase

NP-Y : neuropeptide Y

MR : mannose receptor

PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1

PKA : protein kinase A

PPARγ2 : peroxisome proliferator-activated receptor γ 2

Pref-1 : preadipocyte factor-1

PRR : pattern recognition receptor

RANTES : regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted

RXR : retinoid X receptor

Sfrp5 : secreted frizzled-related protein 5

SRCR : scavenger receptor cysteine-rich

SVF : stromal-vascular cell fraction

TIRAP : toll-interleukin-1 receptor domain containing protein

TE : thioesterase

TGFβ1 : transforming growth factor β1

TLR2 : toll like receptor 2

TLR4 : toll like receptor 4

TNFα : tumor necrosis factor α

TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

【要旨】

メタボリックシンドロームの病態形成を理解する上で、脂肪組織に浸潤・蓄積するマクロファージの重要性が広く認識されている。私は、マクロファージが産生・分泌する AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) が肥大化した脂肪細胞に対して脂肪融解 (Lipolysis) を強力に誘導することを見出した。さらに、AIM による Lipolysis が、メタボリックシンドローム病態形成に必須である脂肪組織へのマクロファージ浸潤に極めて重要な役割を果たすことを明らかとした。これらの結果は、AIM を標的としたメタボリックシンドローム新規治療法の開発を期待させるものである。

【序文】

近年の医学の発達により、過去には不治の病と認識されていた多くの疾患について、その認識が改められている。しかしながら、根本的な治療法が見出せておらず、対症療法による症状の緩和や維持に留まらざるおえない疾患が多く存在することも事実である。これらの疾患に対する根本的な治療法を見出すためには、《なぜ、その病気になるのか》、すなわち、対象とする疾患の病態形成機序を解明し、それに基づく治療法の開発を進める必要がある。

本研究では、刻々と変化する現代社会の生活環境を反映するように表面化してきたメタボリックシンドロームに焦点をあて、病態形成機序の解明とそれに基づく新しい予防法や治療法の可能性について検討した。

メタボリックシンドローム

2010 年（平成 22 年）厚生労働省人口動態統計によれば、全死亡数は 1,194,000 人であり、このうち 3 大死因とよばれる悪性新生物（がん）、心疾患、脳血管疾患による死亡数は 664,000 人に上ると推計されている。3 大死因による死亡数のうち、第 1 位は悪性新生物による死亡（352,000 人）であるが、第 2 位の心疾患（189,000 人）、第 3 位の脳血管疾患（123,000 人）を合計するとほぼ悪性新生物

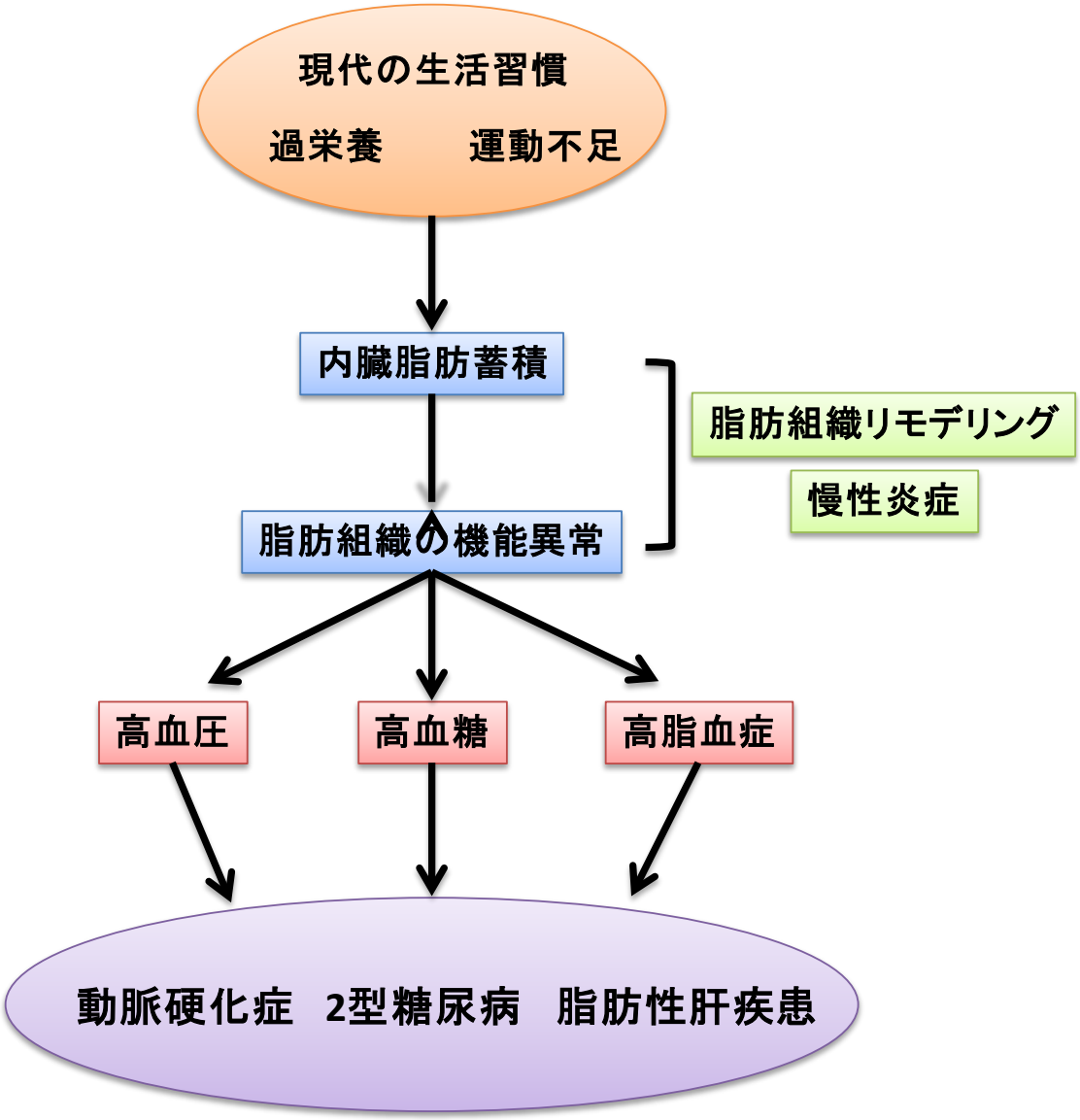
による死亡数に匹敵する。心・脳血管疾患による死亡の増加が、動脈硬化性疾患の罹患者数増加を反映していることは周知の事実であるが、その背景には、欧米型食生活による過栄養や慢性的な運動不足による肥満の増加、生活習慣の変化、高齢化社会への移行に伴い表面化してきたメタボリックシンドロームが深く関与すると考えられている。

1980 年代前半まで､動脈硬化性疾患の発症リスクは高コレステロール血症などの単一リスクファクターにより評価されてきた。しかし、1980 年代後半以降、単一のリスクファクターとその軽重の程度のみに焦点をあてた発症リスク評価ではなく、一個人に多くのリスクファクターが集積した状態に焦点をあて発症リスクを評価することの重要性が相次いで発表され、それらは、内臓脂肪症候群［1］、シンドローム X［2］、死の四重奏［3］、インスリン抵抗性症候群［4］と呼ばれ注目を集めてきた。

現在、それらの名称はメタボリックシンドロームに統一され、内臓脂肪型肥満を基礎として、高血圧、高血糖、脂質代謝異常による高脂血症のうち 2 つ以上を合併し、動脈硬化性疾患に罹患するリスクが極めて高い状態を指す（図Ⅰ）。1998 年に世界保健機構（WHO）、2001 年に米国の NCEP-ATP Ⅲ（National Cholesterol Education Program’s Adults Treatment Panel Ⅲ）から相次いで診断基準が発表されて以来、世界中でその重要性が認識されている［5］。実際、日本に

おいても、冠動脈疾患の発症リスクは、高コレステロール血症に限った単一のリスクファクターを持つ場合よりも肥満、高トリグリセリド血症、高血糖、高血圧のうち 3 因子以上を合併した場合の方が有意に高く、リスクファクターを持たない場合と比較して発症リスクが約 36 倍に著しく上昇することが明らかとされている［6］。また、メタボリックシンドロームでは、動脈硬化症の増悪による心・脳血管疾患リスクの増加に限らず、2 型糖尿病や脂肪性肝疾患の発症リスクも著しく増大することが知られている［7-9］。

メタボリックシンドロームの重要性が広く認識されているにも関わらず、その罹患者数は年々増加を続けており、病態形成機序の解明とそれに基づく予防法ならびに治療法の開発が強く求められている。



図Ⅰ　メタボリックシンドロームの概念

過栄養や慢性的な運動不足に代表される現代の生活習慣により、腹腔内に過剰な脂肪蓄積が起こる。この内臓脂肪型肥満に加え、高血圧、高血糖、高脂血症のうち 2 つ以上が重積することにより、動脈硬化症、2 型糖尿病、脂肪性肝疾患に罹患するリスクが著しく高くなる。

脂肪組織リモデリング

メタボリックシンドロームの基盤病態は、内臓脂肪型肥満とインスリン抵抗性である。なぜ肥満の進行がインスリン抵抗性をもたらすのかは長らく不明であったが、約 20 年前、Bruce M. Spigelman らにより肥満した脂肪組織では炎症性サイトカインの一種として知られる TNFα (tumor necrosis factor α) が発現しており、IRS1 (insulin receptor substrate 1) のセリン残基リン酸化を介してインスリンシグナル伝達を抑制することが報告され、脂肪組織における炎症の惹起が肥満とインスリン抵抗性を結びつけることが明らかとされた［10, 11］。

炎症が肥満とインスリン抵抗性を結びつけると理解される一方で、『なぜ肥満した脂肪組織では炎症が惹起されるのか』という新たな疑問が生み出され、その後 10 年間に渡り、科学的根拠に基づく有力な解答は得られなかった。しかし、2003 年、Anthony W. Ferrante Jr. と Chen H.らにより、肥満の亢進に伴い脂肪組織へとマクロファージが浸潤することで軽度の持続的炎症（慢性炎症）が惹起されることが見出され、脂肪組織のダイナミックな組織像変化と浸潤したマクロファージの働きが注目を集めることとなった［12, 13］。

脂肪組織は、実質細胞である成熟脂肪細胞だけではなく、脂肪前駆細胞、血管構成細胞、線維芽細胞、免疫細胞などの間質細胞により構成されている。肥満の亢進に伴い、脂肪組織では、脂肪細胞の肥大化、血管新生、マクロファージ

やリンパ球、肥満細胞などの免疫細胞の浸潤・蓄積、細胞外マトリックス過剰生産などに特徴づけられる脂肪組織像のダイナミックな変化が認められる［14-19］。このダイナミックな組織像変化は、動脈硬化病変に見られる血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージやリンパ球などの免疫細胞による複雑な相互作用の結果として認められる血管リモデリングに極めて酷似していることから、脂肪組織リモデリングと呼ばれ、正常な脂肪組織の機能に大きな影響を与えることが報告されている［20］。

脂肪組織は余剰のエネルギーをトリグリセリドとして蓄積する貯蔵器官であると同時に、アディポサイトカインと総称される生理活性物質を分泌する内分泌器官としての側面を持つ［21］。脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインは、レプチン［22］、レジスチン［23］、TNFα［24］、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) ［25］、IL-6 (interleukin-6) ［26］、IL-1β［27］、IL-18［28-30］、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ［31-33］などの炎症性アディポカインとアデイポネクチン［34-38］、Sfrp5 (secreted frizzled-related protein 5) ［39］などの抗炎症性アディポカインの 2 つに分類される。痩せている状態の脂肪組織では、抗炎症性アディポカインの発現が高く保たれているが、肥満に伴う脂肪組織リモデリングによりアディポカインの産生調節は破綻し、炎症性アディポカインの産生亢進および抗炎症性アディポカインの産生抑制が認められるようになる

［14, 20］。特に、抗炎症性アディポカインであるアディポネクチンは、脂肪酸酸化と糖取り込み促進による糖・脂質代謝の調節、血管内皮細胞における NO 生産促進による血圧調節、泡沫化マクロファージの抑制を介した動脈硬化の抑制など多彩な生理機能を持つことが知られており、メタボリックシンドロームと深く関連している［40-49］。実際に、内臓脂肪型肥満の亢進に伴いアディポネクチンの血中濃度が低下すること、血中濃度とインスリン感受性が高い相関を示すことが報告されている［50］。

このように、脂肪組織リモデリングによる内分泌器官としての脂肪組織の機能破綻がインスリン抵抗性を引き起こす原因のひとつであると考えられている。

慢性炎症

脂肪組織リモデリングの過程において極めて重要なイベントは、脂肪組織へ浸潤したマクロファージやリンパ球と脂肪細胞の複雑な相互作用による炎症の惹起と維持である。

痩せている状態では、脂肪組織を構成する細胞成分のうち 10 ~ 15 %がマクロファージであり、これらはレジデントマクロファージもしくは M2 マクロファージと呼ばれる。M2 マクロファージは、脂肪組織全体に散逸しており、抗炎症性サイトカインである IL-10 を高発現することから脂肪組織において抗炎症性に

働くことが知られている［51-53］。一方、肥満した脂肪組織におけるマクロファージ成分は 45 ~ 60 %に達し、これらのほとんどは TNFα、IL-6、IL-1βなどの炎症性サイトカインを産生する炎症性マクロファージ（M1 マクロファージ）である［12］。脂肪組織において、M1 マクロファージは、細胞死を起こした脂肪細胞周辺を取り囲むように存在し、CLS (crown-like structure) と呼ばれる特徴的な組織内局在を見せる［52, 54］。M1 / M2 マクロファージ比が逆転し炎症性変化をきたした脂肪組織では、M1 マクロファージと脂肪細胞による相互作用により炎症が惹起・維持されるようになる［52, 55-57］。

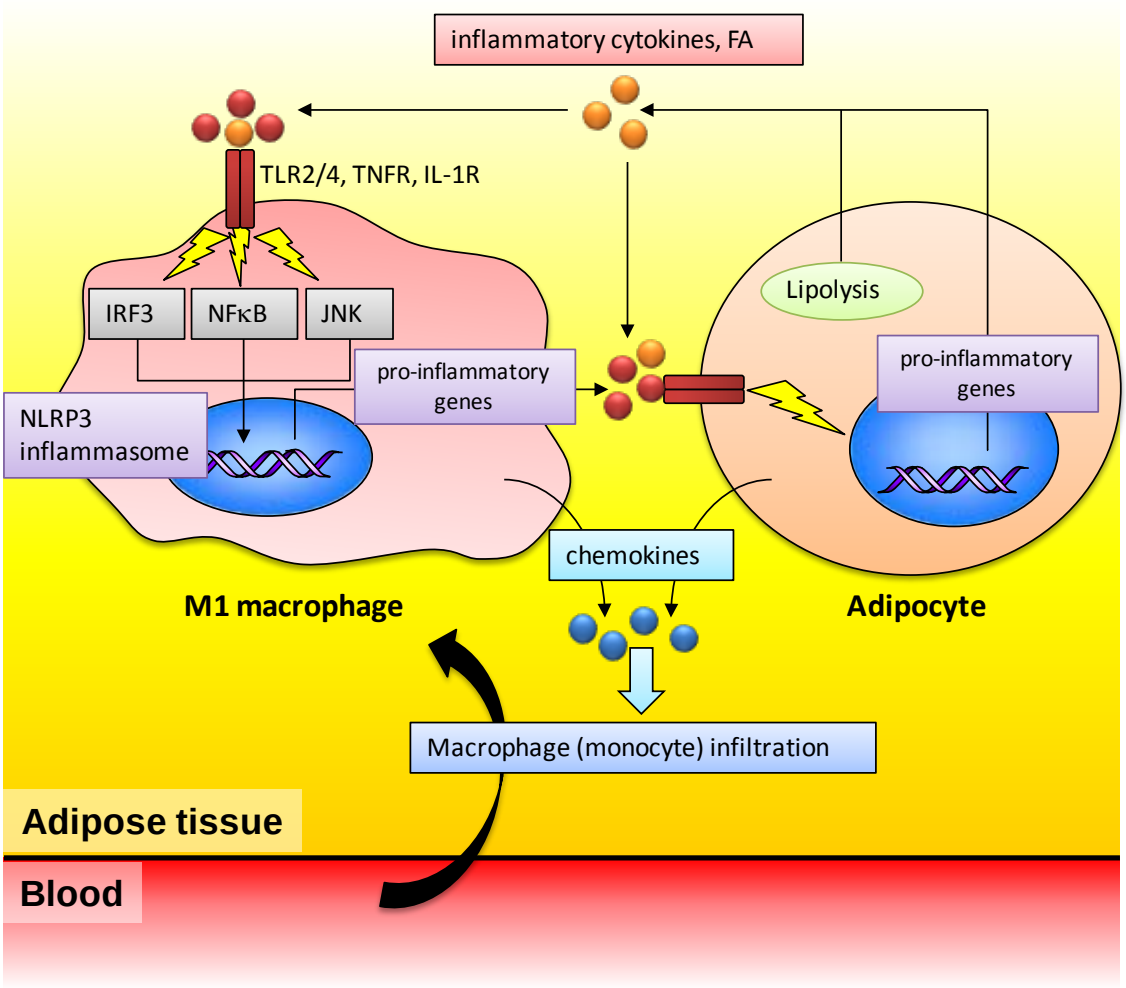
脂肪組織における慢性炎症の病態形成には炎症性サイトカインやケモカイン、飽和脂肪酸などが極めて重要な役割を果たす（図Ⅱ）。M1 マクロファージに由来する TNFαや IL-1βなどの炎症性サイトカインは、インスリン感受性の低下、脂肪細胞の NFκB 活性化を介した炎症性サイトカインの産生、MAPK 経路の活性化を介した Lipolysis を誘導する。その結果、脂肪細胞から炎症性サイトカインや飽和脂肪酸が放出され、近傍のマクロファージに作用し、IL-1 receptor や TLR2 / TLR4 経路を介してマクロファージを活性化させる。活性化されたマクロファージはさらに炎症性サイトカインを産生し炎症を増悪させる。飽和脂肪酸によるマクロファージの活性化は炎症性サイトカインだけではなく、MCP-1 (CCL-2)を含むケモカインの産生を誘導し、脂肪組織へのマクロファージ浸潤を

さらに加速させる。また、飽和脂肪酸は脂肪細胞自身に作用し、TLR2 / TLR4 経路の活性化を介してケモカインや炎症性サイトカインの産生を誘導することで脂肪組織における慢性炎症の増悪に寄与することが知られている［20, 58, 59］。さらに、最近、NLRP3 (NOD-, LRP- and pyrin domain containing 3) インフラマソームが肥満に伴い増加するスフィンゴ脂質セラミドを認識しマクロファージを活性化させることで IL-1βや IL-18 などの炎症性サイトカイン産生に寄与すること［60-62］、MR (mineralocorticoid receptor) シグナル伝達経路がマクロファージにおける抗炎症性サイトカインの産生を抑制し、慢性炎症の維持に寄与すること［63, 64］なども明らかとされている。MCP-1 (CCL-2) 受容体である CCR-2 や TLR4 を欠損するマウスでは、肥満に伴う M1 マクロファージの増加が抑制され、インスリン感受性が改善されることが報告されている［65-68］。すなわち、M1 マクロファージと脂肪細胞の相互作用により生じる慢性炎症がインスリン抵抗性の病態形成に大きく寄与していると考えられる。

さらに、近年、肥満した脂肪組織では、マクロファージと T 細胞や B 細胞の相互作用も認められ、慢性炎症の増悪やインスリン抵抗性の惹起に寄与することが明らかとされた［69-71］。肥満の亢進に伴い脂肪組織に蓄積した T_H1 ($CD4^+$ T helper 1) 細胞は、IFNγ (interferon-γ) を産生し M1 マクロファージを活性化させることが報告されている［69］。また、$CD8^+$ T 細胞は炎症性サイトカインやケ

モカインの産生により M1 マクロファージの浸潤･蓄積ならびに活性化に寄与することが報告されている［70］。さらに、肥満した脂肪細胞には B 細胞の蓄積も認められ、それらは IgG2c 自己抗体を産生することによりマクロファージを活性化しインスリン抵抗性を増悪させることが報告されている［71］。

このように、肥満の亢進に伴う脂肪組織リモデリングにより慢性炎症が惹起された結果、脂肪組織は正常な内分泌器官としての機能を失い、インスリン抵抗性を引き起こすことでメタボリックシンドロームの病態形成に深く関与することが示唆される。



図Ⅱ　マクロファージと脂肪細胞の相互作用による炎症の惹起と増悪

脂肪組織に浸潤・蓄積したマクロファージは脂肪細胞と複雑に相互作用する。IL-6、IL-1β、TNFα、NLRP3 インフラマソーム、飽和脂肪酸などによりマクロファージや脂肪細胞の炎症性シグナル伝達経路が活性化し、ケモカイン産生が亢進する。これにより、脂肪組織へのマクロファージ浸潤・蓄積がさらに促進され、マクロファージ - 脂肪細胞間の炎症増悪サイクルが形成される。その結果、脂肪組織に炎症性変化をもたらし、内分泌器官としての脂肪組織の機能が破綻する。

アポトーシス抑制因子 AIM

アポトーシス抑制因子 AIM (apoptosis inhibitor of macrophage、Api6、Spα、CD5L とも呼ばれる) は、352 アミノ酸から構成される分子量約 54 kDa の分泌型糖タンパク質であり、マクロファージ特異的に産生・分泌される。AIM のタンパク質構造は、アミノ末端のシグナルペプチドと 3 つの SRCR (scavenger receptor cysteine-rich) ドメインから構成されており、SRCR superfamily に属する（**図ⅢA**）［72, 73］。

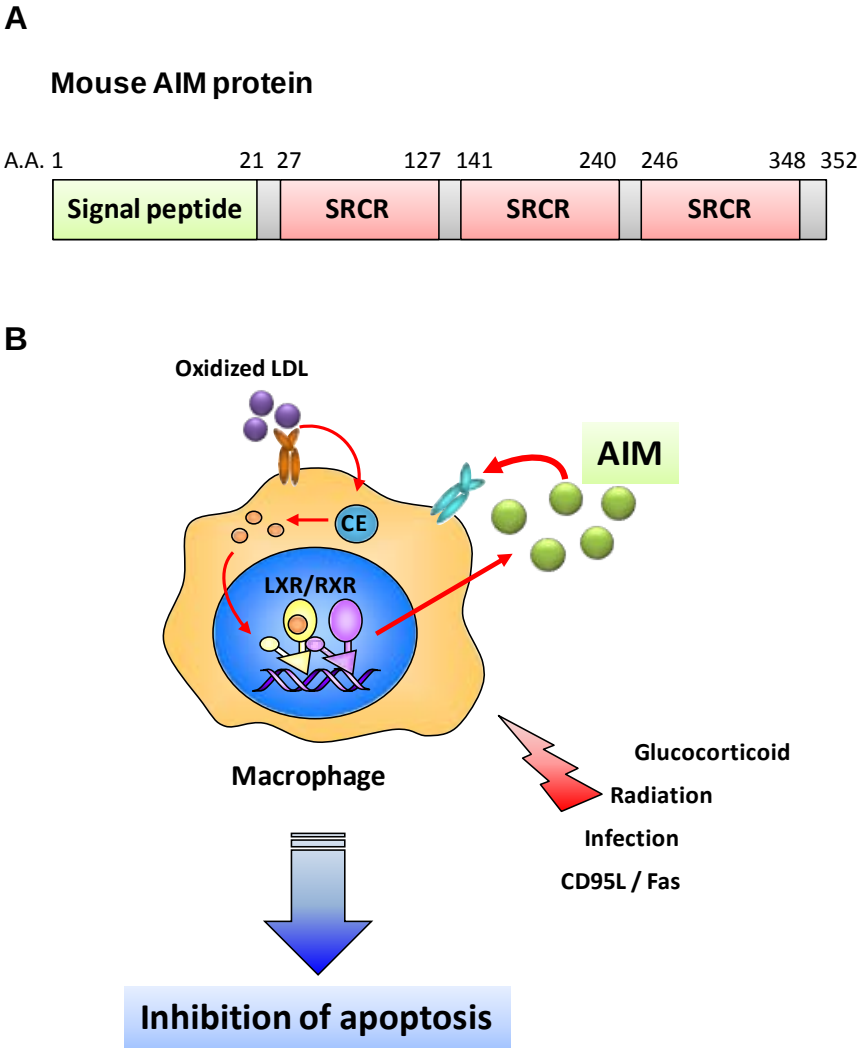
AIM は、T 細胞、NKT (natural killer T) 細胞、マクロファージに対して作用し、CD95L / Fas に代表される様々なアポトーシス誘導刺激によるアポトーシスを抑制する機能を持つことが知られている（**図ⅢB**）［72, 74-77］。マクロファージにおける AIM の遺伝子発現は、核内受容体である LXR / RXR (liver X receptor / retinoid X receptor) ヘテロダイマーにより制御されており、特に、酸化 LDL による刺激を受けたマクロファージで強く誘導される［78, 79］。また、LAL (lysosomal acid lipase) 欠損マウスの解析から、MafB により AIM の遺伝子発現が制御されている可能性が示唆されている［80］。

AIM のマクロファージに対するアポトーシス抑制能は、マクロファージが病態形成に重要な役割を果たす疾患の発症や増悪に大きな影響を与えると考えられる。動脈硬化症では、酸化 LDL を取り込み細胞内に脂肪滴を有する泡沫化マク

ロファージの蓄積が動脈硬化病変の形成と増悪に重要な役割を果たすことが知られている［81］。動脈硬化病巣の泡沫化マクロファージは AIM を強く発現し、自身のアポトーシス抵抗性を著しく高めるため、病巣での泡沫化マクロファージの蓄積が促進され、動脈硬化症を増悪させることが明らかとされている［82］。

AIM はマウスおよび人の血中に豊富に存在することが知られており、健常者と比較して C 型肝炎［83］、肝硬変［84］、肝臓がん［84］、アトピー性皮膚炎［85］、川崎病［86］、ターナー症候群［87］、糖尿病性虚血肢［88］の患者では血中濃度の増加が報告されていることから、これらの疾患に対するバイオマーカーとしての可能性も検討されている。

また、AIM は、アポトーシス抑制能だけではなく、TGFβ1 による B 細胞の増殖を抑制する機能［89］、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌の細胞壁構成成分である LTA (lipoteichoic acid) や LPS (lipopolysaccharide) を認識する PRR (pattern recognition receptor) としての機能［90］、肺における炎症の増悪や肺胞上皮細胞における発癌誘導能［91, 92］など多機能タンパク質としての側面を持つことから、動脈硬化症に限らず様々な疾患の病態形成に関与する可能性がある。



図Ⅲ　アポトーシス抑制因子 AIM の構造と機能

(A) AIM の一次構造（マウス）。AIM は 352 アミノ酸で構成される分子量約 54 kDa の分泌タンパク質であり、マクロファージ特異的に産生される。AIM のタンパク質構造は、アミノ末端のシグナルペプチドと 3 つの SRCR ドメインにより構成されており、SRCR superfamily に属する。(B) AIM の機能。AIM の遺伝子発現は核内受容体である LXR / RXR ヘテロダイマーにより制御されている。酸化 LDL により刺激を受けたマクロファージから分泌された AIM は、マクロファージ自身に作用してアポトーシスを抑制することが知られている。A.A. ; amino acid number, SRCR ; scavenger receptor cysteine-rich, LDL ; low density lipoprotein, CE ; cholesterol ester, LXR / RXR ; liver X receptor / retinoid X receptor

本研究の目的

肥満の亢進に伴い脂肪組織へ浸潤・蓄積したマクロファージは、脂肪組織を構成する様々な細胞と複雑な相互作用を起こし、慢性炎症やインスリン抵抗性を惹起することで内分泌器官としての正常な脂肪組織機能を破綻させ、メタボリックシンドロームの病態形成に深く関与する。しかしながら、より根本的な現象である、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導するメカニズムは明らかにされておらず、メタボリックシンドロームの病態形成機序には依然として議論の余地がある。

また、多機能タンパク質としての側面を有する AIM は、動脈硬化症に限らず様々な疾患に関与する可能性があり、メタボリックシンドロームの病態形成においても重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

ゆえに、本研究では、メタボリックシンドローム病態形成における AIM の役割の解明を目的とし、研究を展開した。

【結果】

第 1 章　脂肪細胞に対する AIM 新規機能の同定

AIM は、動脈硬化病巣マクロファージのアポトーシス抵抗性を高め、動脈硬化症の発症および増悪に深く関与している［82］。また、マクロファージはメタボリックシンドロームの病態形成、とりわけ脂肪組織における慢性炎症ならびにインスリン抵抗性の惹起において極めて重要な役割を果たすことが報告されている［10-20］。

しかしながら、脂肪組織における AIM の機能および役割についてはこれまで報告がなく不明であった。そこで、本研究では、まず脂肪組織における AIM の機能および役割の解明を試みた。

脂肪組織に浸潤・蓄積したマクロファージは AIM を発現する

肥満に伴い脂肪組織へ浸潤・蓄積したマクロファージによる AIM の発現を検討するため、$AIM^{+/+}$ (C57/BL6) マウスに高脂肪食 (HFD) を 20 週間負荷し、肥満モデルを作製した。HFD を 20 週間負荷した $AIM^{+/+}$マウスの脂肪組織では、通常餌で飼育したマウス（非肥満）の脂肪組織と比較して、顕著なマクロファー

ジの浸潤・蓄積ならびに CLS の形成が認められた（**図 1A**）。さらに、免疫組織化学による解析から、肥満した脂肪組織に浸潤・蓄積したマクロファージは AIM 陽性であることが認められた。また、AIM 陽性マクロファージは IL-6 陽性であることから、M1 マクロファージであることが示唆された。非肥満マウスの脂肪組織では、少数の M2 マクロファージ（レジデントマクロファージ）が存在するのみであり、これらは AIM 陰性であった（**図 1B**）。

AIM の発現がマクロファージによるものであることを明らかにするため、肥満した脂肪組織からマクロファージおよび脂肪細胞を単離し、定量 PCR による *AIM* 遺伝子の発現を解析した。AIM の遺伝子発現はマクロファージにおいてのみ認められ、脂肪細胞では認められなかった（**図 2**）。また、マウス胎仔由来線維芽細胞の亜種であり、in vitro において脂肪細胞へと分化誘導可能な 3T3-L1 細胞を用いて、脂肪細胞への各分化段階における *AIM* 遺伝子の発現を定量 PCR により解析した。脂肪細胞への各分化段階において *AIM* 遺伝子の発現は認められなかった（**図 3**）。

これらの結果は、肥満に伴い脂肪組織へと浸潤ならびに蓄積した M1 マクロファージが AIM を発現することを示しており、脂肪組織において AIM が何らかの生理的役割を担っている可能性を示唆させるものであった。

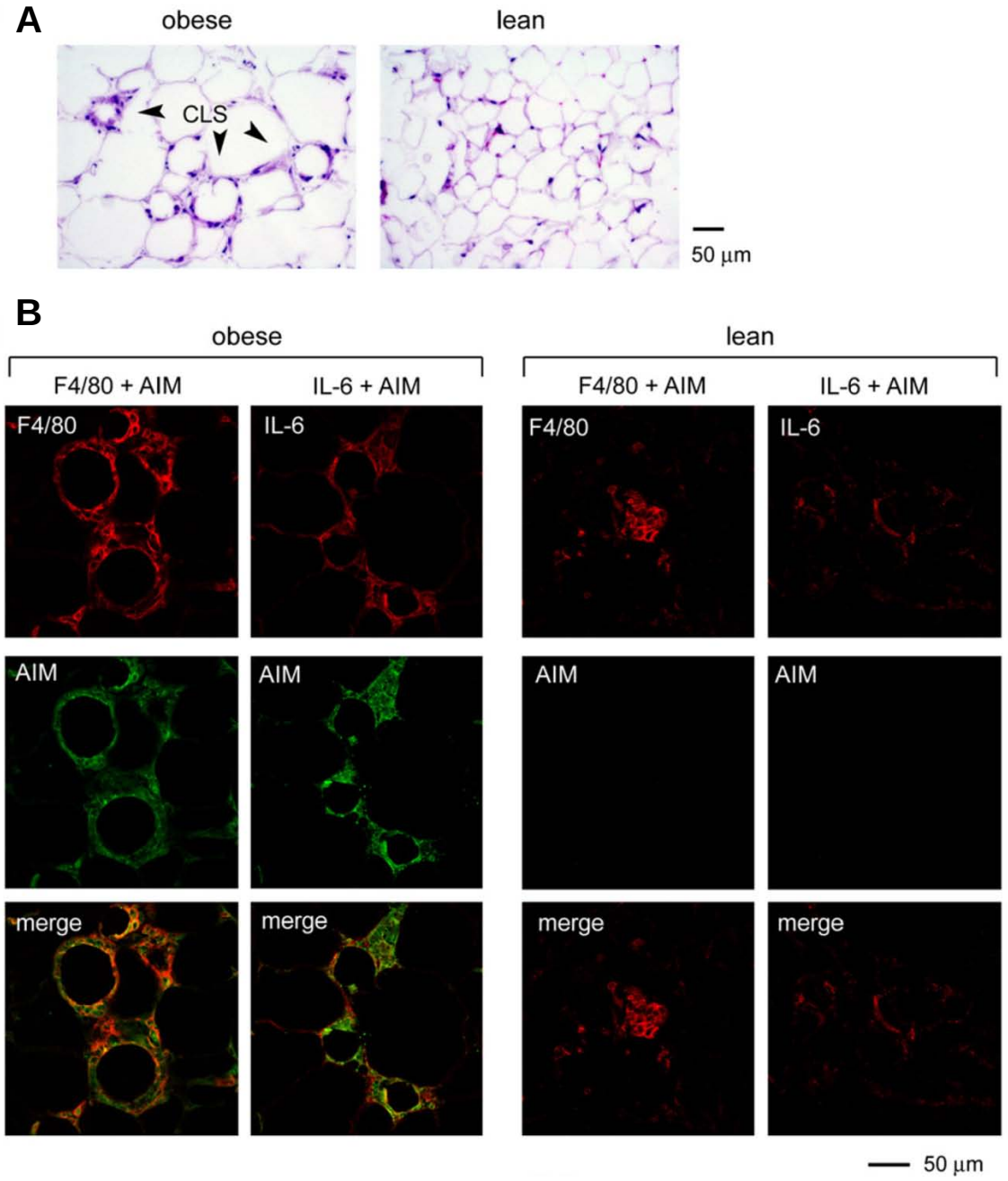


図 1　免疫組織化学による脂肪組織での AIM 発現解析

(A) HFD を 20 週間負荷した AIM$^{+/+}$マウス脂肪組織の HE 染色像。マクロファージの浸潤と CLS の形成が認められた。矢頭は CLS 形成部位を示す。(B) 肥満した脂肪組織および痩せている状態の脂肪組織における AIM（緑）、F4/80（マクロファージマーカー、赤）、IL6（M1 マクロファージマーカー、赤）の蛍光染色像。肥満に伴い脂肪組織へと浸潤した M1 マクロファージには AIM の発現が認められた。

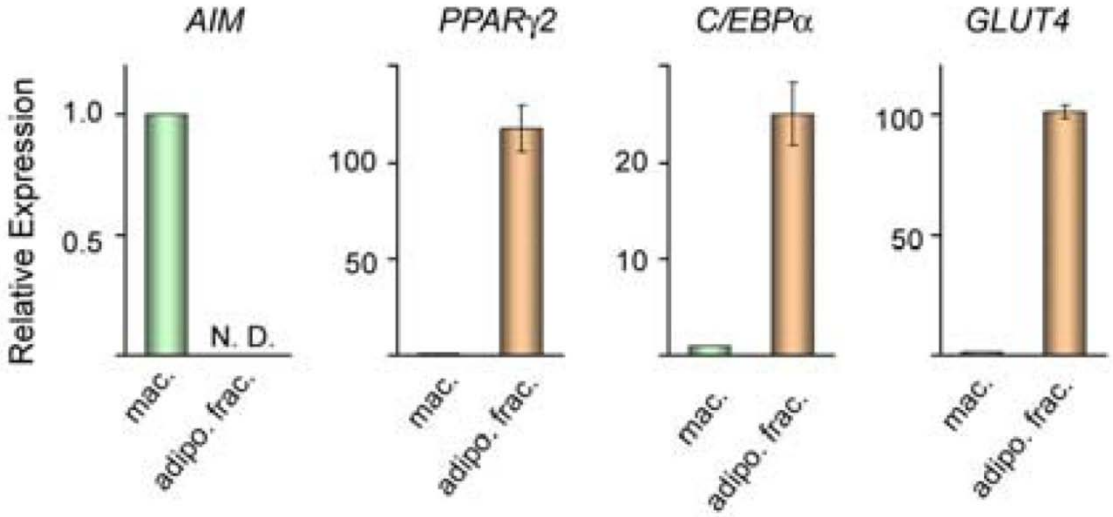


図 2　脂肪組織における *AIM* 遺伝子発現解析

脂肪組織マクロファージおよび脂肪細胞における AIM の発現。HFD を 20 週間負荷した $AIM^{+/+}$マウス脂肪組織からマクロファージおよび脂肪細胞を単離し、定量 PCR にて AIM の発現を解析した。また、脂肪細胞マーカー遺伝子（*pparγ2, c/ebpα, glut4*）発現を解析した。AIM の発現はマクロファージでのみ認められ、脂肪細胞では認められなかった。n = 3、平均±SEM、mac.; macrophage, adipo. frac. ; adipocyte fraction

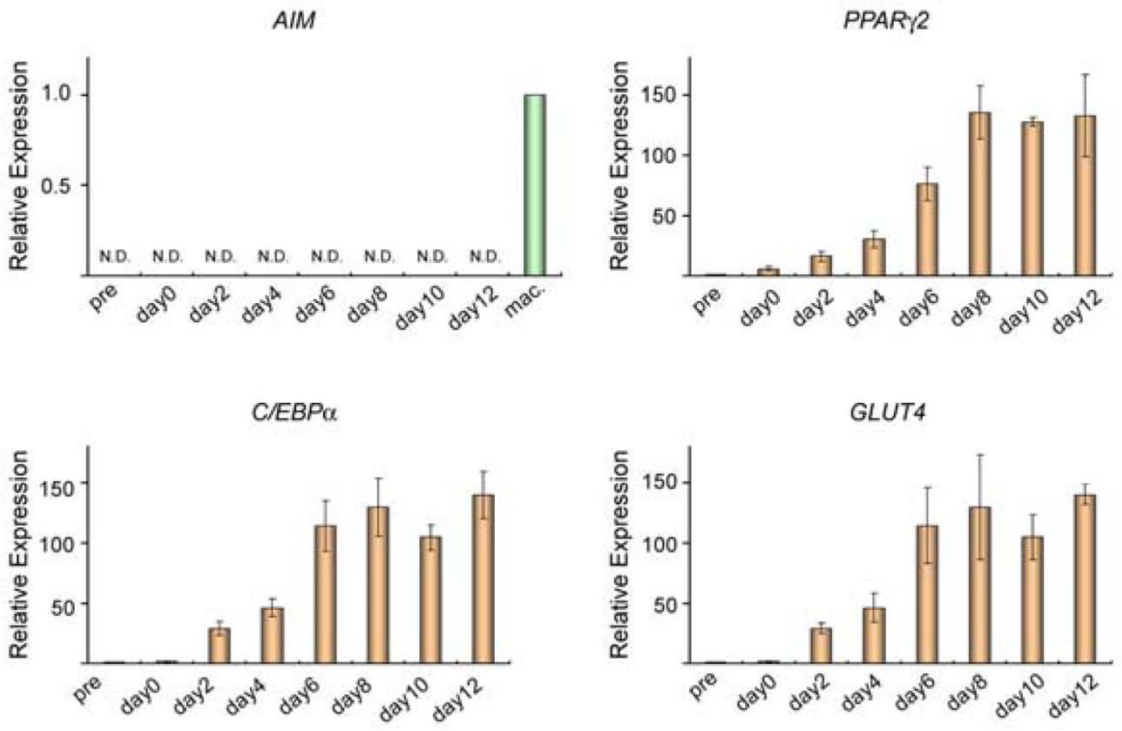


図 3　脂肪細胞の各分化段階における *AIM* 遺伝子発現解析

3T3-L1 細胞を成熟脂肪細胞へと分化させ、各分化段階における *AIM* 遺伝子の発現を定量 PCR により解析した。また、脂肪細胞マーカー遺伝子（*pparγ2, c/ebpα, glut4*）の発現を解析した。*AIM* 遺伝子発現のポジティブコントロールとしてマクロファージを用いた。3T3-L1 細胞の各分化段階において、AIM の遺伝子発現は認められなかった。n = 3、平均±SEM

AIM はエンドサイトーシスにより脂肪細胞に取り込まれる

肥満した脂肪組織の免疫組織化学像を詳細に解析したところ、AIM を発現していない脂肪細胞からも AIM の蛍光シグナルが検出された（**図 4**）。これは、マクロファージにより産生された AIM が近隣の脂肪細胞に作用し何らかの影響を及ぼす可能性を示唆させるものであった。この可能性を検討するため、HFD を 20 週間負荷した $AIM^{-/-}$マウスに対し、rAIM を脂肪組織局所的および静脈内投与し、脂肪組織における AIM の分布を解析した。その結果、rAIM の投与経路に関わらず、AIM の蛍光シグナルはマクロファージだけではなく脂肪細胞においても認められた（**図 4**）。

AIM と脂肪細胞の相互作用を詳細に解析するため、まず、脂肪細胞へと分化させた 3T3-L1 細胞を rAIM で処理し、免疫染色により解析した。AIM の蛍光シグナルは、PPARγ2 陽性脂肪細胞の細胞内にのみ検出され、PPARγ2 弱陽性の不完全に分化した脂肪細胞や未分化の 3T3-L1 細胞ではほとんど検出されなかった（**図 5**）。これらの結果から AIM は脂肪細胞内へ取り込まれ何らかの効果を及ぼす可能性が示唆された。

次に、脂肪細胞における AIM 取り込み経路を明らかにするため、AIM の細胞内局在を免疫染色および免疫電子顕微鏡観察により検討した。複数のオルガネラマーカーと AIM の免疫共染色の結果、AIM は EEA1 （初期エンドソームマー

カー）と共局在し、Rab7 （後期エンドソームマーカー）や Rab11 （リサイクリングエンドソームマーカー）とは局在が一致しなかった（**図 6A**）。さらに、免疫電子顕微鏡観察から、エンドサイトーシス開始時に特有な細胞膜の陥入部位およびエンドソームに AIM の局在が認められた（**図 7**）。興味深いことに、細胞質からも AIM が検出され、脂肪細胞内で AIM が細胞質に局在する可能性が示唆された。また、リソソーム、油滴、ミトコンドリア、ファゴソーム、小胞体、核などのオルガネラでは、AIM の局在が認められなかった（**図 6B**、**図 7**）。

これらの結果から、AIM はエンドサイトーシスにより脂肪細胞へ取り込まれることが明らかとなった。また、AIM は初期エンドソームに局在し、後期エンドソームおよびリサイクリングエンドソームには局在しないことから、初期エンドソームから細胞質へ移行し、何らかの働きをする可能性が示唆された。

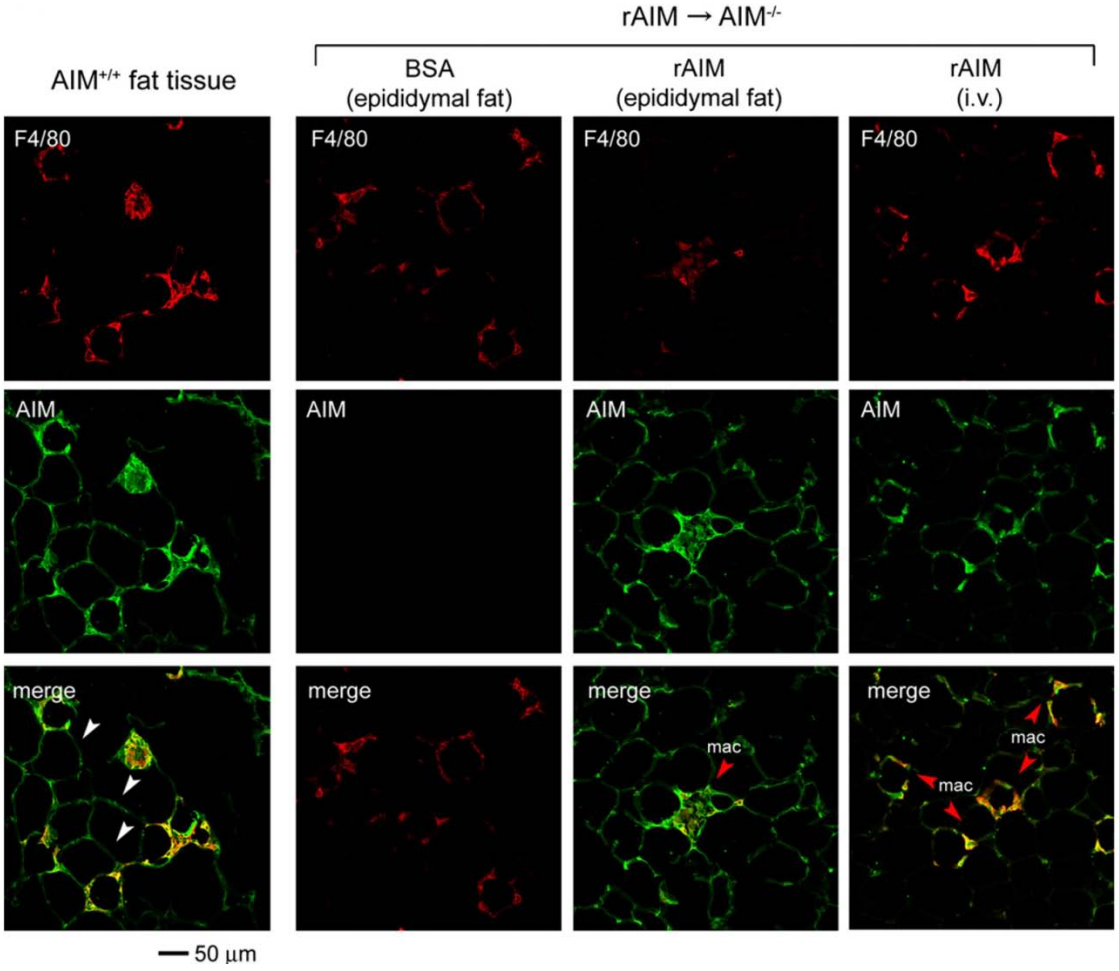


図 4　脂肪組織における AIM の分布

(A) HFD を 20 週間負荷した $AIM^{+/+}$マウス脂肪組織の蛍光免疫組織化学像。AIM（緑）および F4/80（マクロファージマーカー、赤）で染色を行った。AIM のシグナルはマクロファージだけではなく脂肪細胞にも認められた。白い矢頭は脂肪細胞を示す。(B) HFD を 20 週間負荷した $AIM^{-/-}$マウスの脂肪組織における rAIM の取り込み。rAIM を脂肪組織局所的（rAIM 投与量：100 μg）ならびに全身投与後（rAIM 投与量：300 μg）、AIM の分布を免疫組織化学染色により確認した。$AIM^{+/+}$マウスの脂肪組織と同様に、AIM のシグナルはマクロファージだけではなく脂肪細胞にも認められた。赤い矢頭はマクロファージを示す。

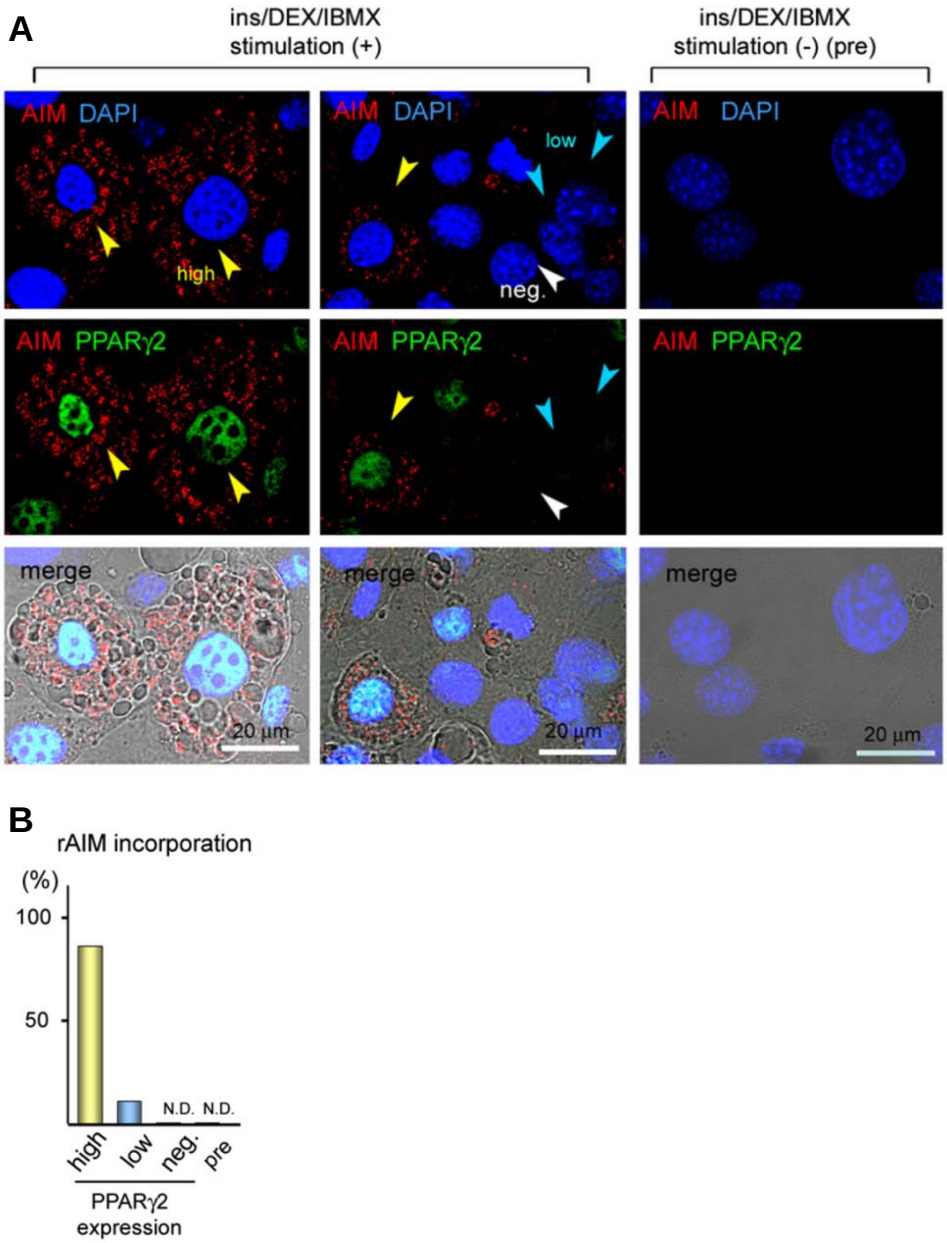


図 5　脂肪細胞における AIM の取り込み

(A) 3T3-L1 細胞における AIM の取り込み。3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化させ AIM の取り込みを免疫染色により解析した。PPARγ2（緑）の発現が認められる脂肪細胞内に AIM（赤）のシグナルが認められた。核は Hoechst により染色した（青）。(B) AIM 取り込み率。100 細胞あたりの AIM 取り込み率を解析した。完全に分化した約 80 %の細胞に AIM は取り込まれていた。黄色矢頭は完全に分化した 3T3-L1 細胞を示す。青色矢頭は PPARγ2 発現が不完全な 3T3-L1 細胞を示す。白色矢頭は分化していない 3T3-L1 細胞を示す。rAIM: 5 μg/ml

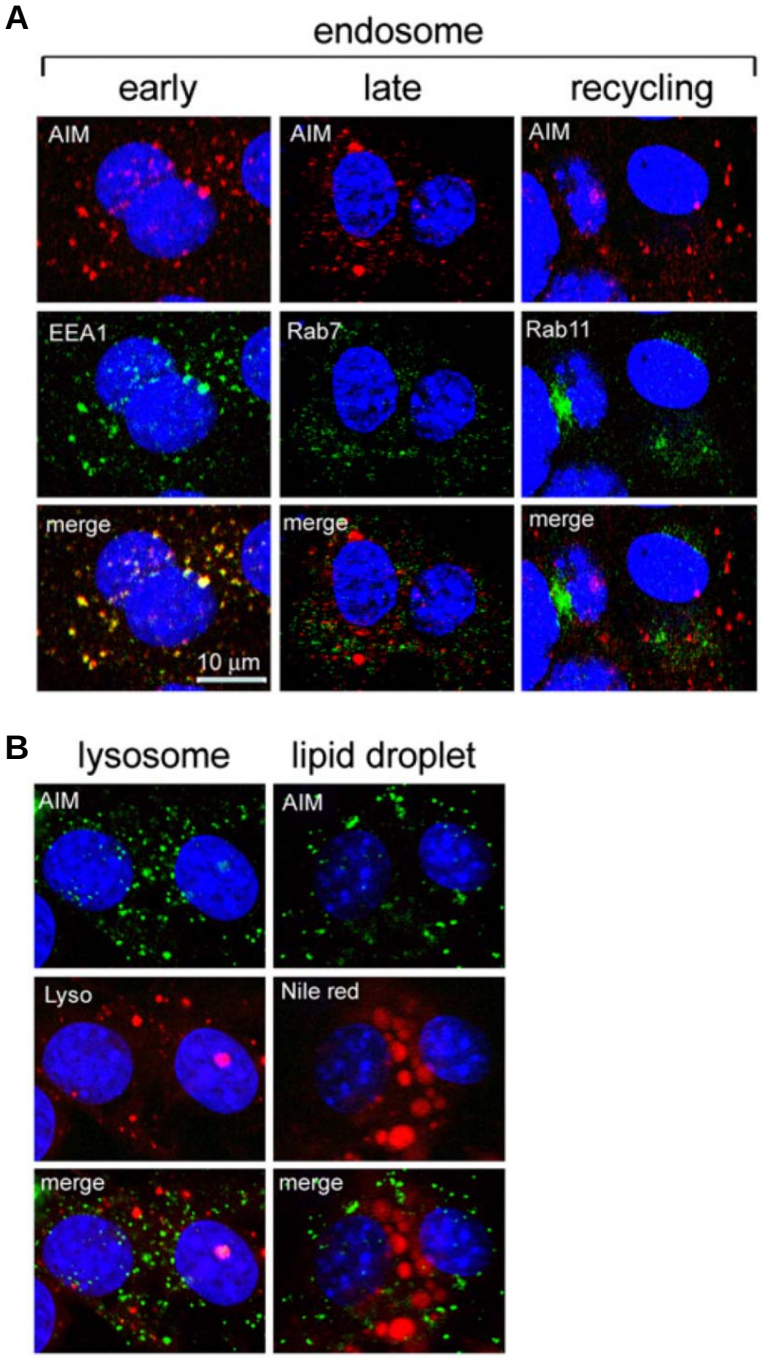


図 6　脂肪細胞における AIM の細胞内局在

(A)各エンドソームマーカーとの共染色。AIM と EEA1 （初期エンドソーム）、rab7（後期エンドソーム）、rab11（リサイクリングエンドソーム）との共染色の結果、AIM は初期エンドソームに局在した。また、細胞質に局在する可能性も示唆された。(B) リソソームおよび Lipid droplet との共染色。AIM とこれらオルガネラとの共局在は認められなかった。rAIM: 5 μg/ml

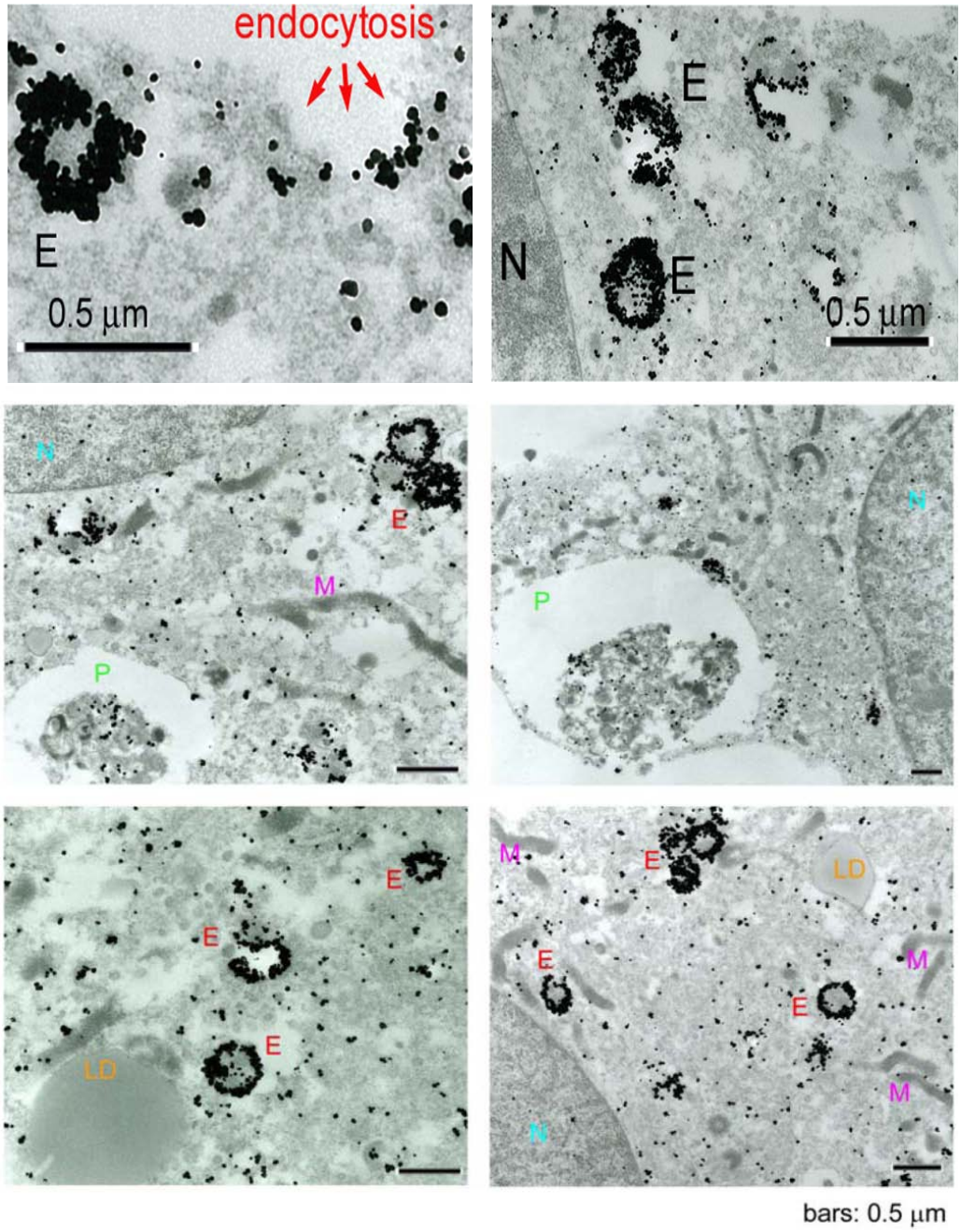


図 7　免疫電子顕微鏡による AIM 細胞内局在解析

脂肪細胞へと分化した 3T3-L1 細胞における AIM の細胞内局在を免疫電子顕微鏡により解析した。エンドサイトーシスによる AIM の取り込み、エンドソームへの局在が認められた。また、細胞質に局在する可能性も示唆された。ミトコンドリア、lipid droplet、ファゴソーム、小胞体、核への局在は認められなかった。rAIM: 5 µg/ml , E; endosome, M; mitochondria, P; phagosome, LD; lipid droplet, N; nucleus

脂肪細胞における AIM の取り込みはスカベンジャー受容体 CD36 により介在される

AIM はエンドサイトーシスにより脂肪細胞へ取り込まれることから、脂肪細胞表面に発現する何らかの分子が AIM と相互作用し、エンドサイトーシスを仲介していると考えられる。そこで、本研究では、脂肪細胞において AIM のエンドサイトーシスを仲介する分子の同定を試みた。

AIM はマクロファージに作用しアポトーシスを抑制する作用を持ち［72, 75］、脂肪細胞に取り込まれて何らかの働きをすることが示唆される。したがって、AIM の取り込みを仲介する分子は、マクロファージと脂肪細胞の細胞表面に発現する分子であると考えられる。また、図 5、図 6、図 7 に示した結果から、AIM は脂肪細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれると考えられるため、候補となる分子はエンドサイトーシスに関与するものであると推測される。さらに、AIM の遺伝子発現は、脂質が豊富な動脈硬化巣病変において、酸化 LDL による刺激を受け泡沫化したマクロファージで強く誘導され、脂肪毒性に対して防御的に働くことが報告されている［78, 82］。また、本研究の結果から、AIM は脂肪細胞において何らかの働きを担っている可能性が示唆されている。これらの知見から、AIM は脂質が豊富な環境下で機能する可能性が高いと考えられ、AIM のエンドサイトーシスを仲介する分子も脂質が豊富な環境条件に応答し何らかの働きをする分子であることが想定される。マクロファージを代表とした様々

な細胞の細胞表面に発現し、細胞外からの物質をエンドサイトーシスにより細胞内に取り込むことで様々な細胞応答を引き起こす分子としてはスカベンジャー受容体が知られている［137］。スカベンジャー受容体は SRCR ドメインの構造の違いから大きく 2 つに大別され、SRCR ドメインに 6 つのシステイン残基を持つものはクラス A スカベンジャー受容体として、SRCR ドメインに 8 つのシステイン残基を持つものはクラス B スカベンジャー受容体として、それぞれ知られている［137］。これらスカベンジャー受容体の機能は多岐にわたるが、特にクラス B スカベンジャー受容体に属する SR-B1 や CD36 は脂質代謝に深く関与することが報告されている［93-95, 138, 139］。

SR-B1 は脂肪細胞、マクロファージ、肝細胞などの細胞表面に発現する分子量 82 kDa の 2 回膜貫通型糖タンパク質であり、HDL 受容体として機能し、コレステロールの細胞内への取り込みや末梢組織から肝臓へのコレステロール輸送に重要な役割を果たす［139-141］。しかしながら、SR-B1 と結合した HDL はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれずコレステロールのみが取り込まれること［139, 142］、SR-B1 の欠損は AIM の欠損とは逆に動脈硬化症を増悪させることが報告されており［138, 143-145］、SR-B1 により AIM のエンドサイトーシスが仲介されているとは考え難い。

CD36 は、SR-B1 と同様に脂肪細胞やマクロファージなどを含む多くの細胞の

細胞表面に発現する分子量 78~88 kDa の 2 回膜貫通型糖タンパク質である［93, 146, 147］。CD36 はトロンボスポンジン［93, 146, 147］、コラーゲン［93, 146, 147］、熱帯熱マラリア感染赤血球（PfEMP1）［93, 146-148］、アポトーシスを起こした細胞（死細胞）［146, 147］、Advanced Glycation End products （AGE）［149］、酸化 LDL［146, 147, 150］、VLDL［151］、長鎖脂肪酸［146, 147, 152］、リン脂質や過酸化リン脂質［153, 154］など様々な物質に対する受容体として機能しており、これらをエンドサイトーシスにより細胞内に取り込むことで細胞応答を誘導することが知られている。特に、酸化 LDL を含む脂質を細胞内に取り込む機能を有することから脂質代謝において重要な役割を果たしていると考えられる。

実際に、CD36$^{-/-}$マウスでは AIM$^{-/-}$マウスの表現型と同様に、動脈硬化病変における泡沫化マクロファージの蓄積が軽減されることが報告されている［130］。AIM の標的細胞（マクロファージや脂肪細胞など）を含めた様々な細胞における発現パターン、広いリガンド認識性とエンドサイトーシスによるそれらの取り込みや脂質代謝への重要性などから、CD36 が AIM のエンドサイトーシスを仲介している可能性があると考えられる。そこで、本研究では AIM のエンドサイトーシスを仲介する分子の候補として CD36 に着目した。

CD36 が脂肪細胞における AIM のエンドサイトーシスを仲介しているか検討するため、CD36 中和抗体を作用させた脂肪細胞における AIM の取り込みを免疫

染色により解析した。その結果、CD36 中和抗体を作用させた脂肪細胞では、コントロール群（IgA 添加群）と比較して脂肪細胞における AIM の取り込みが抑制された（**図 8A, B**）。さらに、CD36$^{-/-}$マウスに rAIM を静脈内投与し、脂肪組織における AIM の取り込みを免疫染色法により検討したところ、CD36$^{-/-}$マウスの脂肪組織では AIM の取り込みがほとんど認められなかった（**図 8C**）。

これらの結果から、脂肪細胞において、CD36 は AIM のエンドサイトーシスを介在する分子のひとつである事が示唆された。

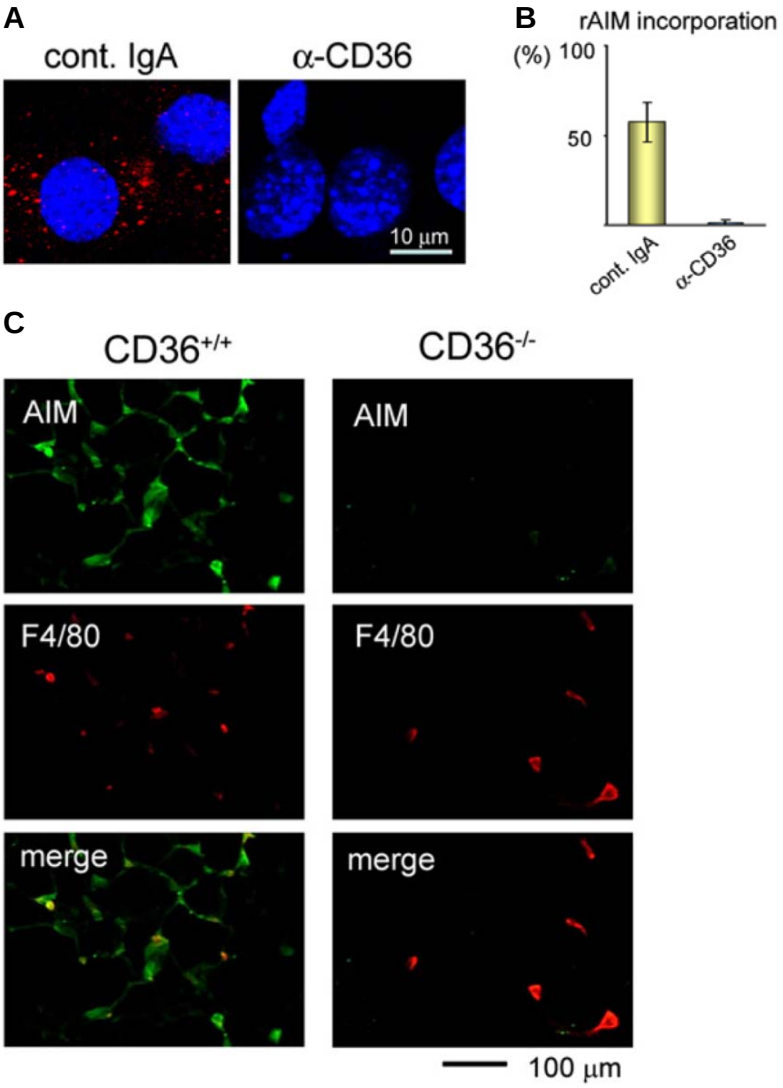


図 8 AIM は CD36 を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞内へ取り込まれる
(A) CD36 中和抗体による AIM の取り込み阻害。CD36 中和抗体で処理した脂肪細胞では AIM（赤）の取り込みが阻害された。rAIM: 5 μg/ml (B) CD36 中和抗体による AIM の取り込み阻害率。 (C) $CD36^{-/-}$マウスの脂肪組織における AIM の取り込み。$CD36^{-/-}$マウスの脂肪組織では AIM の取り込みが認められなかった。rAIM 投与量：200 μg、 AIM（赤）、F4/80（緑）。

AIM は脂肪細胞において Lipolysis を誘導し油滴を縮小する効果を持つ

AIM は脂肪細胞に CD36 を介したエンドサイトーシスにより取り込まれることが明らかとなったが、脂肪細胞における AIM の機能については、これまで報告がなく不明であった。そこで、脂肪細胞における AIM の機能について検討した。

3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化誘導し、分化 6 日目から 12 日目までの 6 日間 rAIM により刺激した（**図 9A**）。rAIM 刺激後、Oil red O 染色により脂肪細胞を形態学的に解析したところ、rAIM 添加群では、非添加群と比較して明らかに脂肪細胞の油滴サイズおよび油滴保持細胞数（Oil red O 染色陽性細胞数）が減少していた（**図 9B, 9C**）。脂肪細胞に対する AIM の効果を詳細に解析するため、rAIM 添加後、2 日間ごとに細胞上清を回収し、上清中に含まれるグリセロール濃度および遊離脂肪酸（FFA）濃度を検討した。rAIM 添加群では、非添加群と比較して添加 2 日後から明らかにグリセロール濃度および FFA 濃度が上昇していた（**図 10**）。また、rAIM 刺激による油滴構成タンパク質関連遺伝子（*fsp27, perilipin, adipophilin*）、脂肪細胞マーカー遺伝子（*pparγ2, c/ebpα, glut4*）、脂肪前駆細胞マーカー遺伝子（*pref-1*）の発現変動について定量 PCR により解析した。rAIM 添加群では、非添加群と比較して添加 2 日後から *fsp27, perilipin, adipophilin* の発現が有意に抑制されていた（**図 11A**）。*pparγ2, c/ebpα, glut4, pref-1* の発現については、両群ともに有意な差は認められなかった（**図 11B**）。すなわち、AIM

による油滴の縮小は、脂肪細胞の脱分化によるものではなく、Lipolysis の促進によるトリグリセリドの分解に起因することが示唆された。

さらに、*in vivo* における AIM の効果を検討するため、HFD を 20 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織に rAIM を局所投与し、24 時間後に *fsp27, perilipin, adipophilin, pparγ2, c/ebpα, glut4, pref-1* の遺伝子発現を定量 PCR により解析した。3T3-L1 細胞を用いた *in vitro* での実験結果と同様に、rAIM 投与群では、BSA 投与群と比較して、*fsp27, perilipin, adipophilin* の発現が有意に抑制されていた（**図 12A**）。*pparγ2, c/ebpα, glut4, pref-1* の発現については、両群ともに有意な差は認められなかった（**図 12B**）。

これらの結果から、AIM は脂肪細胞に対して、Lipolysis を誘導することで脂肪細胞に蓄積された油滴を縮小する効果を持つことが示唆された。

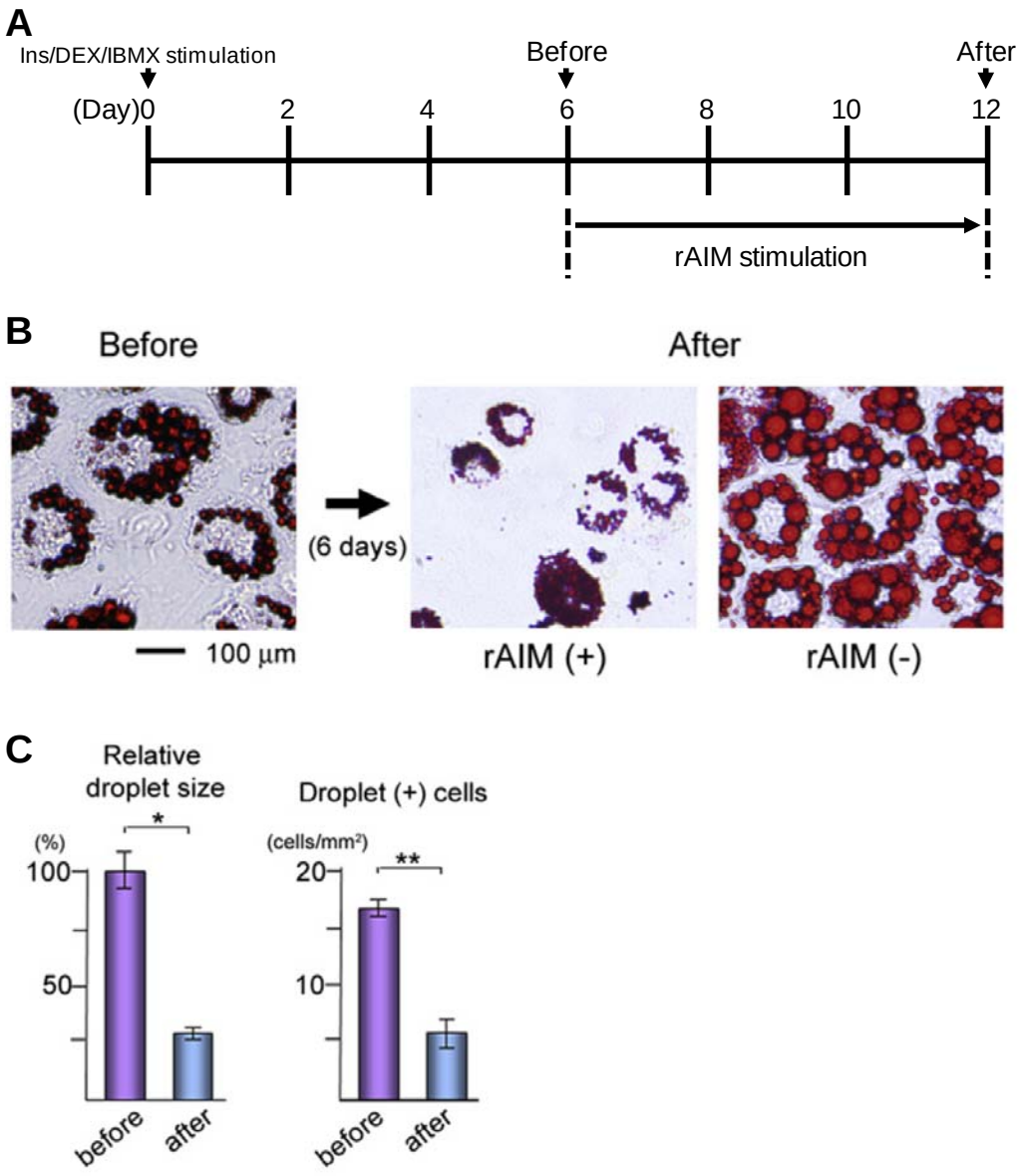


図 9 脂肪細胞における AIM の油滴縮小効果

(A) 実験スケジュール。分化誘導 6 日後から 12 日まで 5 µg/ml の rAIM を作用させた。(B) 3T3-L1 細胞の形態学的解析。分化誘導 6 日目および 12 日目の 3T3-L1 細胞を Oil red O で染色したところ、rAIM 添加により油滴（赤）の縮小が認められた。(C) 油滴サイズおよび油滴保持細胞数の定量的解析。rAIM 添加により油滴サイズの縮小ならびに油滴保持細胞の減少が認められた。 n = 50、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01

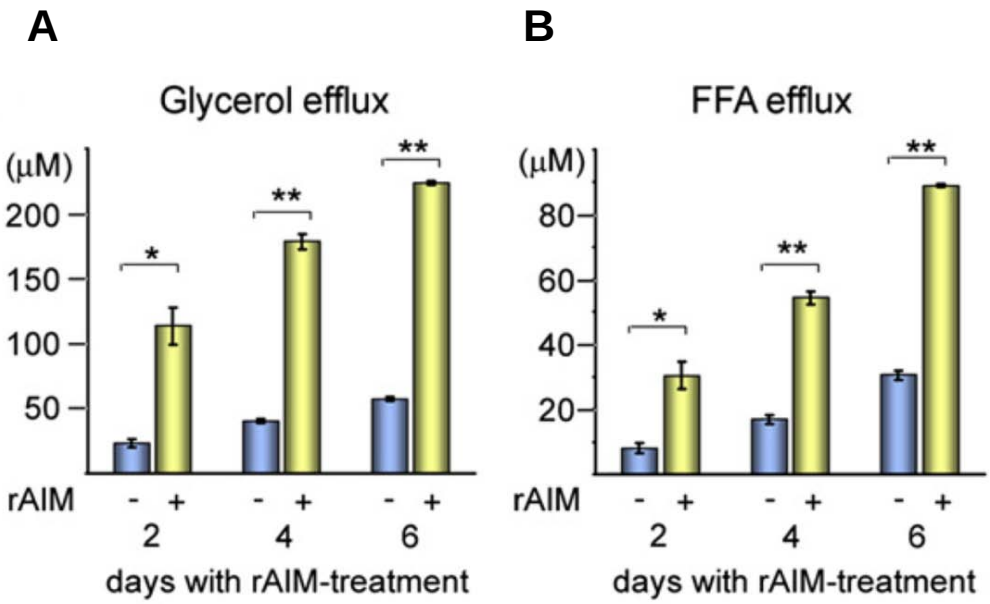


図 10　AIM はグリセロールおよび遊離脂肪酸（FFA）の放出を促進する

(A) 培養上清中のグリセロール濃度、(B) 培養上清中の FFA 濃度。rAIM 添加群（rAIM: 5 μg/ml）では非添加群と比較して、グリセロールおよび FFA 濃度の著しい上昇が認められた。n = 3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01

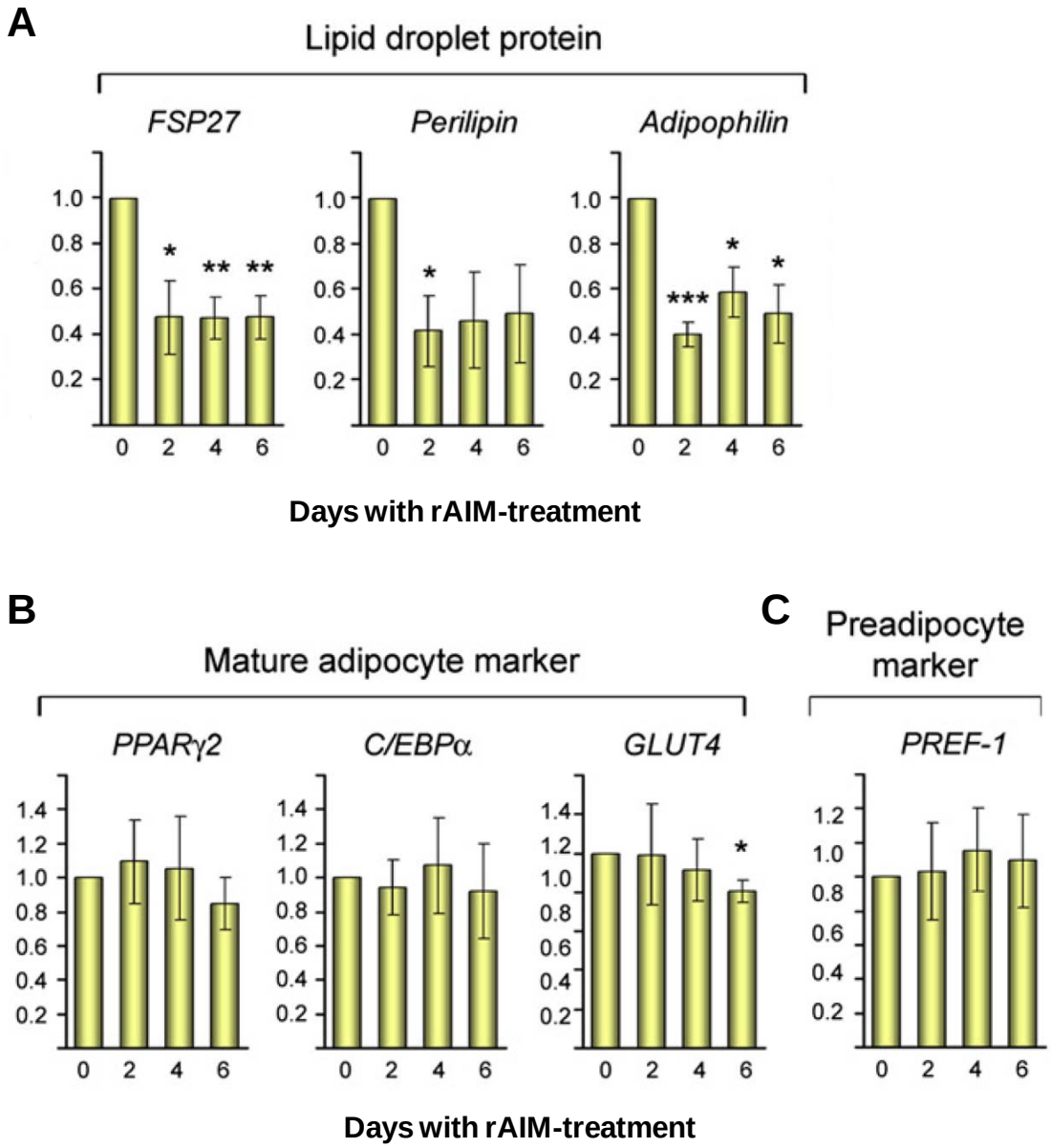


図 11　AIM は油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現を抑制する（*in vitro*）

(A) 油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現解析。rAIM 刺激（rAIM: 5 μg/ml）により、油滴構成タンパク質をコードする遺伝子（*fsp27, perilipin, adipophilin*）の発現抑制が認められた。(B)脂肪細胞マーカー遺伝子の発現解析。rAIM 刺激による脂肪細胞マーカー遺伝子（*pparγ2, c/ebpα, glut4*）の有意な発現変動は認められなかった。(C) 脂肪前駆細胞マーカー遺伝子の発現解析。AIM 刺激により脂肪前駆細胞マーカー（*pref-1*）の有意な発現変動は認められなかった。n = 3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、***;P<0.001

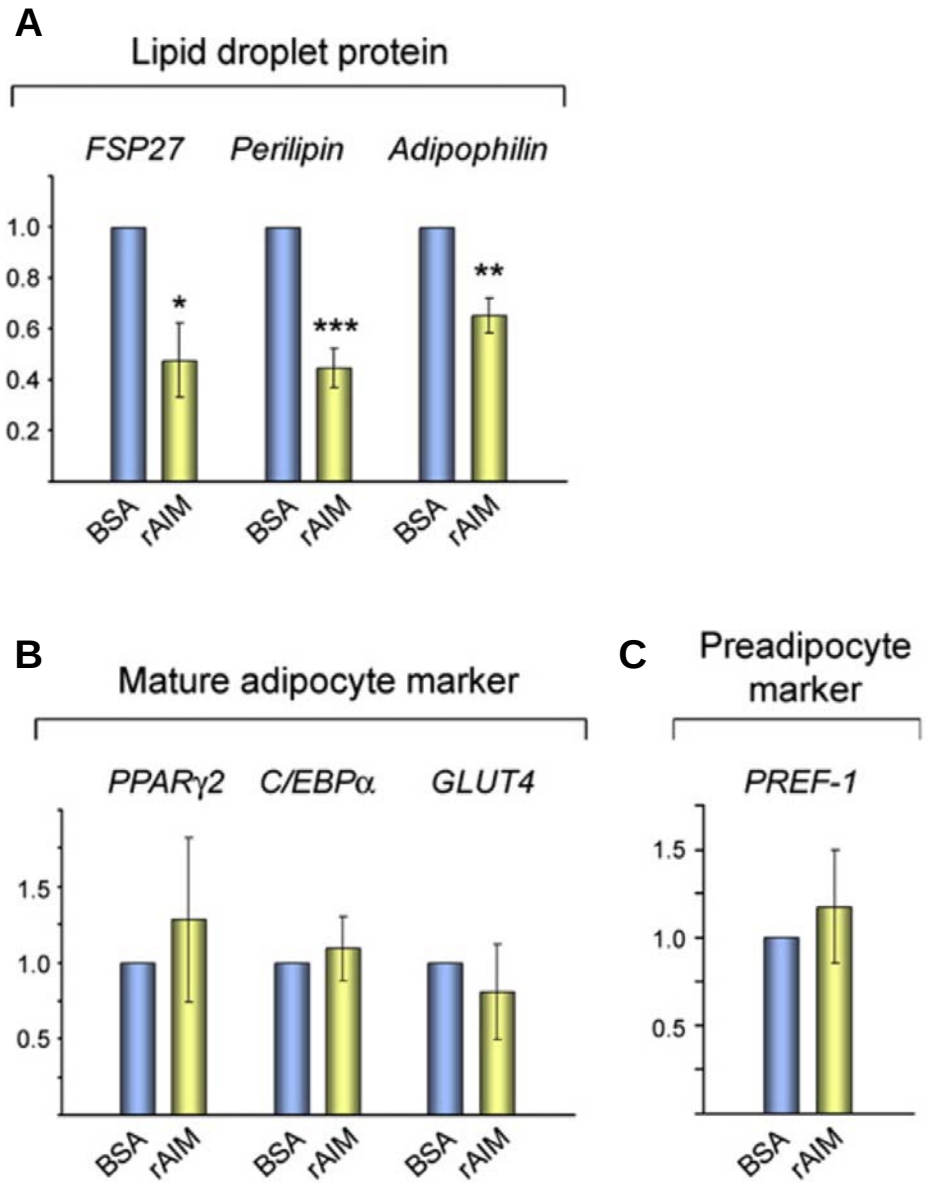


図 12　AIM は油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現を抑制する（*in vivo*）

(A) 油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現解析。rAIM の脂肪組織への局所投与（rAIM 投与量: 100 μg）により、油滴構成タンパク質をコードする遺伝子（*fsp27, perilipin, adipophilin*）の発現抑制が認められた。(B)脂肪細胞マーカー遺伝子の発現解析。rAIM の脂肪組織への局所投与による脂肪細胞マーカー遺伝子（*pparγ2, c/ebpα, glut4*）の有意な発現変動は認められなかった。(C) 脂肪前駆細胞マーカー遺伝子の発現解析。rAIM の脂肪組織への局所投与による脂肪前駆細胞マーカー（*pref-1*）の有意な発現変動は認められなかった。n = 7、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、***;P<0.001

AIM は脂肪組織重量に影響を与える

AIM の生理的作用について検討するため、$AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスに HFD を 20 週間負荷し、肥満に伴う脂肪組織重量ならびに脂肪細胞サイズの変化について解析した。$AIM^{-/-}$マウスでは、$AIM^{+/+}$マウスと比較して、脂肪細胞サイズの増大が認められた（**図 13A**）。さらに、HFD 負荷により、$AIM^{-/-}$マウスでは、$AIM^{+/+}$マウスと比較して体重が有意に増加しており、それは内臓脂肪重量および皮下脂肪重量の有意な増加に起因するものであった（**図 13B**）。また、$AIM^{-/-}$マウスでは $AIM^{+/+}$マウスより肥満した状態にあるにも関わらず、血中グリセロールおよび血中 FFA 濃度が有意に低下していた（**図 13C**）。$AIM^{-/-}$マウスにおける肥満の亢進が基礎代謝率の変化に起因したものであるかを検討するため、体温、食餌量、酸素消費量、自発運動活性を測定したところ、$AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウス間では、これらのパラメーターに有意な差は認められなかった（**図 14**）。

さらに、AIM による脂肪組織重量の抑制効果を明確に示すため、$AIM^{-/-}$マウスに HFD を負荷しながら rAIM を 300 μg/マウス/週 2 回の条件で 5 週間連続投与し、体重増加量、脂肪重量の変化、油滴構成タンパク質関連遺伝子、脂肪細胞マーカー遺伝子、脂肪前駆細胞マーカー遺伝子の発現変動を解析した。rAIM 投与群では、BSA 投与群と比較して HFD 負荷による体重増加量が有意に抑制された（**図 15A**）。HFD を 5 週間負荷した後の体重についても、rAIM 投与群では BSA 投与

群と比較して有意に低下しており、それは内臓脂肪重量および皮下脂肪重量の減少に起因するものであった（**図 15B**）。また、油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現は、rAIM 投与群で有意に抑制されていたが、脂肪細胞マーカー遺伝子の発現については、両群ともに有意な差は認められなかった（**図 16A, 16B**）。脂肪前駆細胞マーカー遺伝子の発現は、rAIM 投与群において有意に増加していた（**図 16C**）。これは、後に述べる AIM による脂肪細胞分化抑制効果により、脂肪組織中に存在する未分化な脂肪前駆細胞の割合が上昇したためであると考えられた。

これらの結果から、AIM は脂肪細胞に対して直接作用することにより、脂肪重量に影響を与えることが強く示唆された。

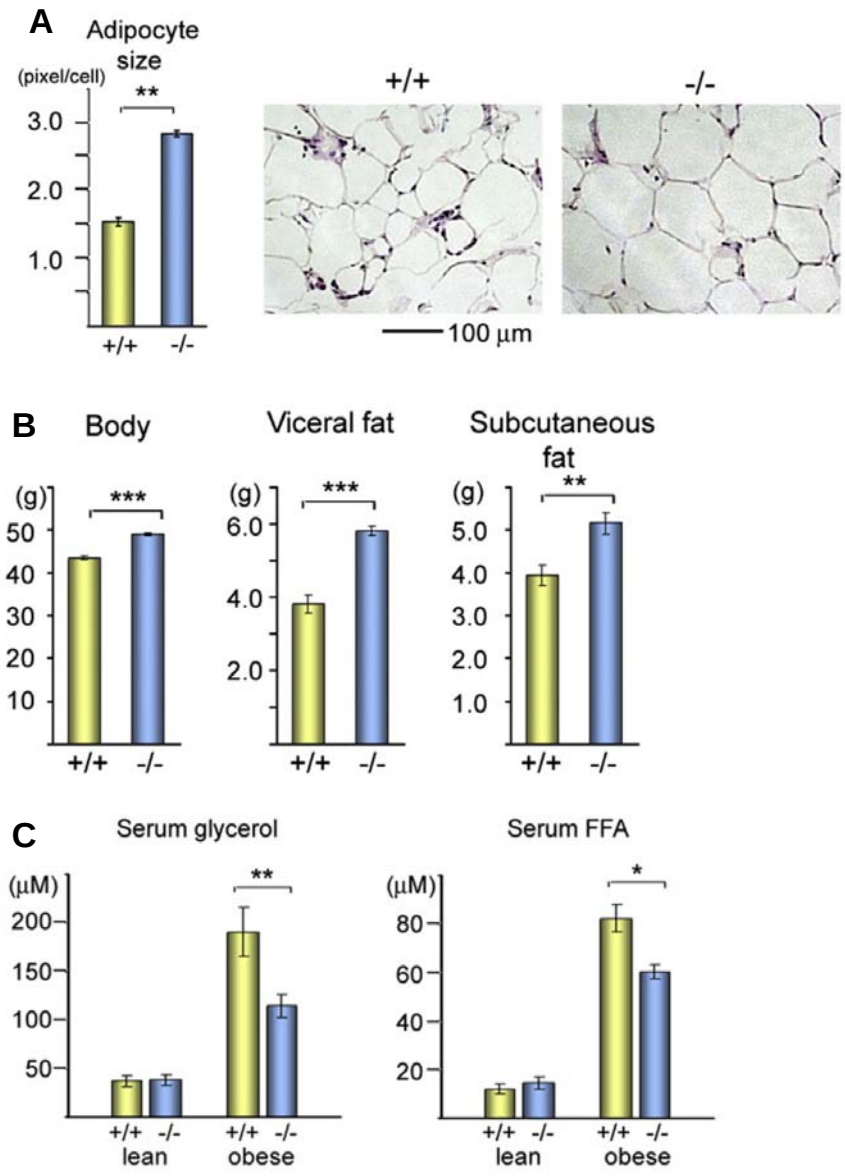


図 13　長期 HFD 負荷が AIM$^{-/-}$マウスに与える影響

(A) 脂肪細胞サイズ。HFD を 20 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスでは、AIM$^{+/+}$マウスと比較して脂肪細胞サイズの増大が認められた。脂肪細胞サイズは独立した 50 個の脂肪細胞から測定した。(B) 体重および脂肪重量。HFD 負荷 AIM$^{-/-}$マウスでは、AIM$^{+/+}$マウスと比較して体重、内臓脂肪重量および皮下脂肪重量の増大が認められた。(C) 血中グリセロールおよび血中 FFA 濃度。HFD 負荷 AIM$^{-/-}$マウスは、AIM$^{+/+}$マウスより肥満しているにも関わらず、血中グリセロールおよび血中 FFA 濃度の上昇が抑制されていた。n = 6-7、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、***;P<0.001

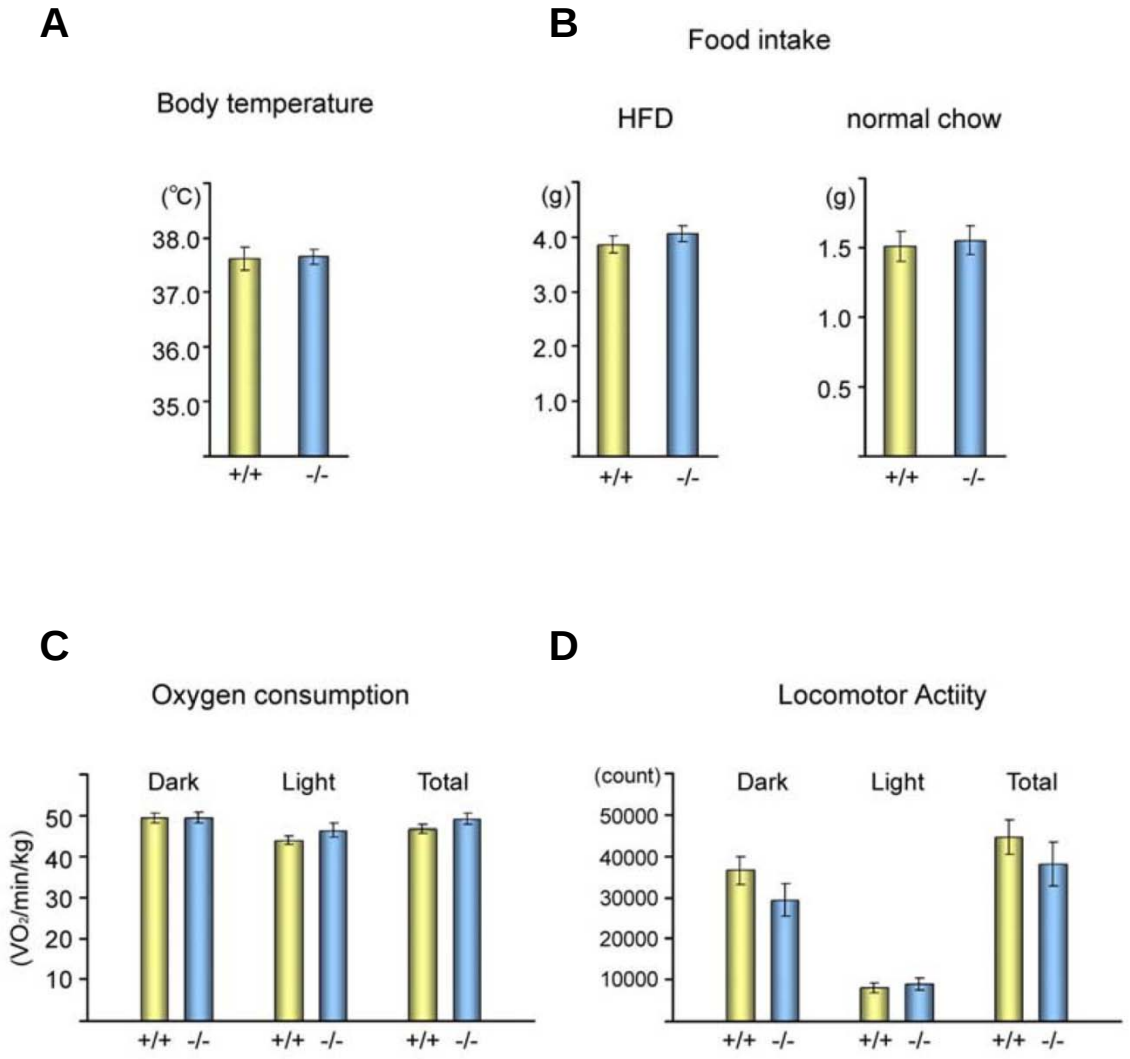


図 14　肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスにおける基礎代謝パラメーターの比較

(A) 体温、(B) 食餌量、(C) 酸素消費量、(D) 自発運動活性。HFD を 20 週間負荷した肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスにおいて、これらの基礎代謝パラメーターに有意な差は認められなかった。n = 8、平均±SEM

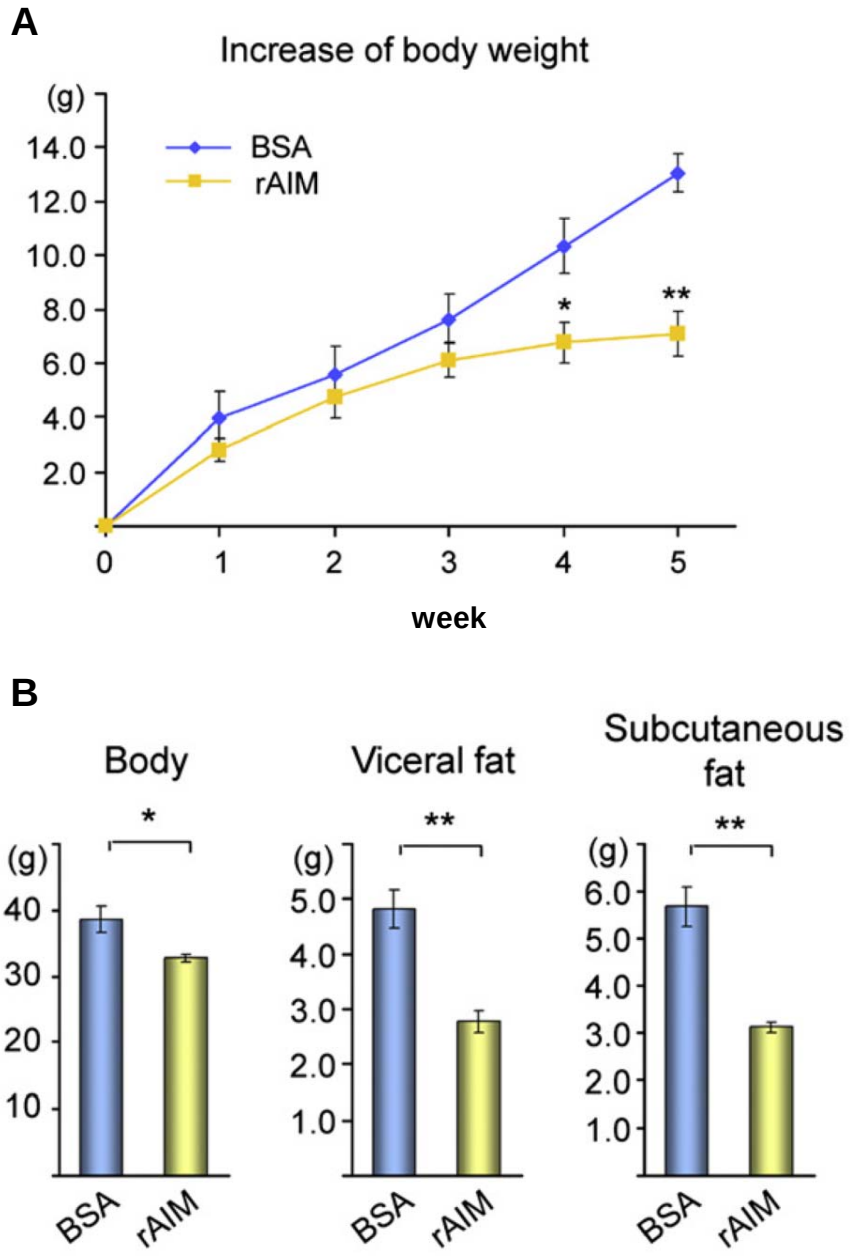


図 15　AIM 投与が脂肪重量増加に及ぼす影響

(A) HFD 負荷に伴う体重増加量の変化。rAIM の連続投与（全身）群では HFD 負荷に伴う体重増加量の抑制が認められた。(B) 体重および脂肪重量。rAIM の連続投与（全身）群では HFD 負荷に伴う体重、内臓脂肪重量および皮下脂肪重量の増加が抑制された。n = 5-6、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、rAIM 投与条件：300 μg/マウス/週 2 回（5 週間連続投与）

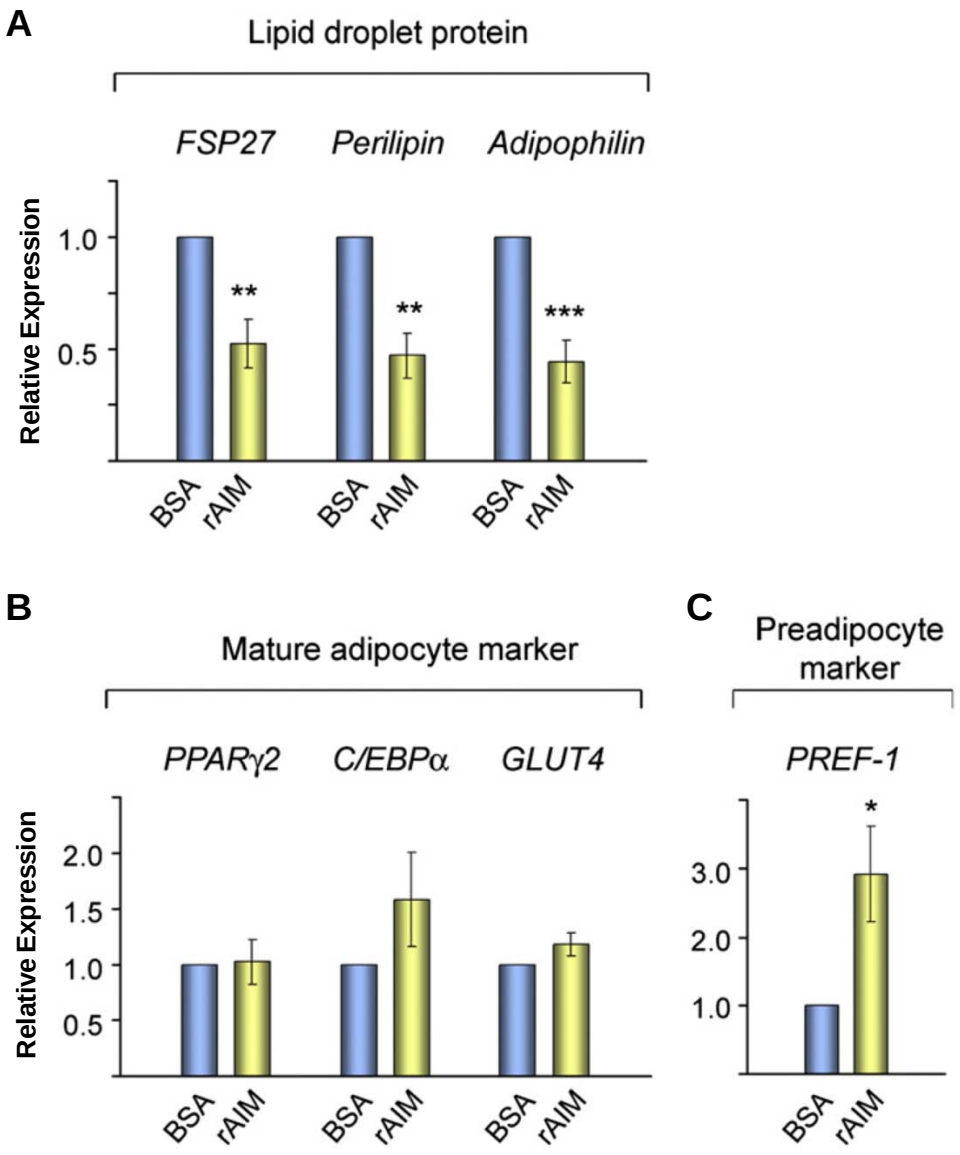


図 16　AIM 投与が油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現に及ぼす影響

(A) 油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現解析。rAIM の連続投与（全身）群では、油滴構成タンパク質をコードする遺伝子（*fsp27, perilipin, adipophilin*）の発現抑制が認められた。(B) 脂肪細胞マーカー遺伝子の発現解析。rAIM の連続投与（全身）群では、脂肪細胞マーカー遺伝子（*pparγ2, c/ebpα, glut4*）の発現変動は認められなかった。(C) 脂肪前駆細胞マーカー遺伝子の発現解析。rAIM の連続投与（全身）群では、脂肪前駆細胞マーカー（*pref-1*）の発現上昇が認められた。n = 5-6、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、***;P<0.001、rAIM 投与条件：300 μg/マウス/週 2 回（5 週間連続投与）

AIM は脂肪細胞において脂肪酸合成酵素（FAS; Fatty Acid Synthase）インヒビターとして機能する

これまでの結果から、AIM が脂肪細胞に作用し Lipolysis を誘導する機能を持つことが示唆されたが、その作用機序については不明であった。AIM による Lipolysis 誘導機構を解明するためには、脂肪細胞内において AIM が相互作用する分子を同定する必要がある。そこで、本研究では、IP-MS (Immunoprecipitation-mass spectrometry) による網羅的解析から AIM と相互作用する分子の同定を試みた。

rAIM により刺激した 3T3-L1 細胞、$AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスの肝臓や脂肪組織を用いた IP-MS 解析により、脂肪酸合成酵素 (FAS; Fatty Acid Synthase) 、carbamoyl phosphate synthase-1、major vault protein、aldehyde dehydrogenase family member L1 を候補分子として得た。

これらの候補分子のうち、FAS は脂肪組織や肝臓に高発現しており、acetyl-CoA と malonyl-CoA を基質としてパルミチン酸（C16:0）を作り出す極めて重要な酵素である。FAS は、分子量 262 kDa の巨大なタンパク質であり、KS (ketoacyl synthase)ドメイン、MAT (malonyl / acetyl transferase)ドメイン、DH (dehydrase)ドメイン、CC (central core)ドメイン、ER (enoylreductase)ドメイン、KR (ketoreductase)ドメイン、ACP (acyl carrier protein)ドメイン、TE (thioesterase)ドメ

インと呼ばれる 8 つのドメイン構造を持ち、ホモ 2 量体を形成することにより脂肪酸合成能を活性化することが知られている［96］。また、哺乳類の FAS は細胞質に局在し機能することが知られている［96］。さらに、$FAS^{-/-}$マウスは胚性致死の表現型を示し、この表現型は母体への脂質投与により改善されないことから、内在性 FAS の脂肪酸合成能の重要性が示唆されている［97］。生化学的解析に加え、コンディショナルノックアウトマウスを用いた遺伝学的解析から、脂肪重量の調節における FAS の重要性が報告されている［98-107］。これらに加え、本研究で示してきた AIM の機能を鑑みて 4 つの候補分子のうち脂質代謝に深く関与することが示唆される FAS に着目し研究を展開した。

まず、AIM と FAS の相互作用を、AIM-HA および FAS-FLAG を過剰発現させた HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降法（co-IP; co-immunoprecipitation）により解析した。その結果、rAIM-HA と FAS-FLAG の共沈が認められた（**図 17A, 17B**）。さらに、$AIM^{-/-}$マウス脂肪組織に rAIM-HA を局所投与し、rAIM-HA と内在性 FAS の結合を共免疫沈降法により解析したところ、rAIM-HA と FAS の共沈が認められた（**図 18**）。これらの結果から、AIM は細胞内で FAS と相互作用する可能性が強く示唆された。

前述したように、FAS には 8 つのドメインがあり、FAS の脂肪酸合成能を機能的および構造的に支持している。従って、FAS における AIM の相互作用部位を

同定することは、FAS に対する AIM の機能を考察するうえで重要であると考えられた。そこで、FAS における AIM 相互作用部位の同定を試みた。FLAG タグを付加した FAS 全長および FAS の 8 つのドメインを AIM 安定発現細胞株（AIM-HA/HEK293T 細胞）に過剰発現させ、co-IP により AIM 相互作用部位を解析した。その結果、AIM と FAS の DH ドメイン、CC ドメイン、ER ドメイン、TE ドメインとの共沈が認められた（**図 19**）。これら 4 つのドメインは、脂肪酸合成時における炭素鎖の延長や最終産物であるパルミチン酸の酵素からの放出、FAS のホモ 2 量体構造の安定化に寄与するドメインであることが知られており［96］、AIM が FAS を機能的および構造的に阻害する可能性が示唆された（**図 20**）。

まず、AIM が FAS の 2 量体構造に与える影響を検討するため、rAIM を作用させた 3T3-L1 細胞における 2 量体 FAS の含量をウエスタンブロットにより解析した。rAIM 添加群では、非添加群と比較して、高い酵素活性をもつ FAS の 2 量体が減少していた（**図 21A**）。次に、AIM が FAS インヒビターとしての機能を持つか検討するため、rAIM 刺激後の 3T3-L1 細胞における FAS 酵素活性を解析した。その結果、rAIM 添加群では、非添加群と比較して、FAS 酵素活性が約 43% 減少した（**図 21B**）。さらに、HFD を 20 週間負荷した肥満 $AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスの脂肪組織における FAS 酵素活性を比較したところ、$AIM^{-/-}$マウスの脂肪

組織では FAS 酵素活性が約 26%亢進していた（**図 21C**）。また、AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織に rAIM を局所投与し FAS 酵素活性を測定したところ、rAIM 投与群では BSA 投与群と比較して FAS 酵素活性が約 44%減少しており、rAIM による内在性 FAS 酵素活性の有意な抑制が認められた（**図 21D**）これらの結果から、AIM は脂肪細胞において FAS インヒビターとして機能することが示唆された。

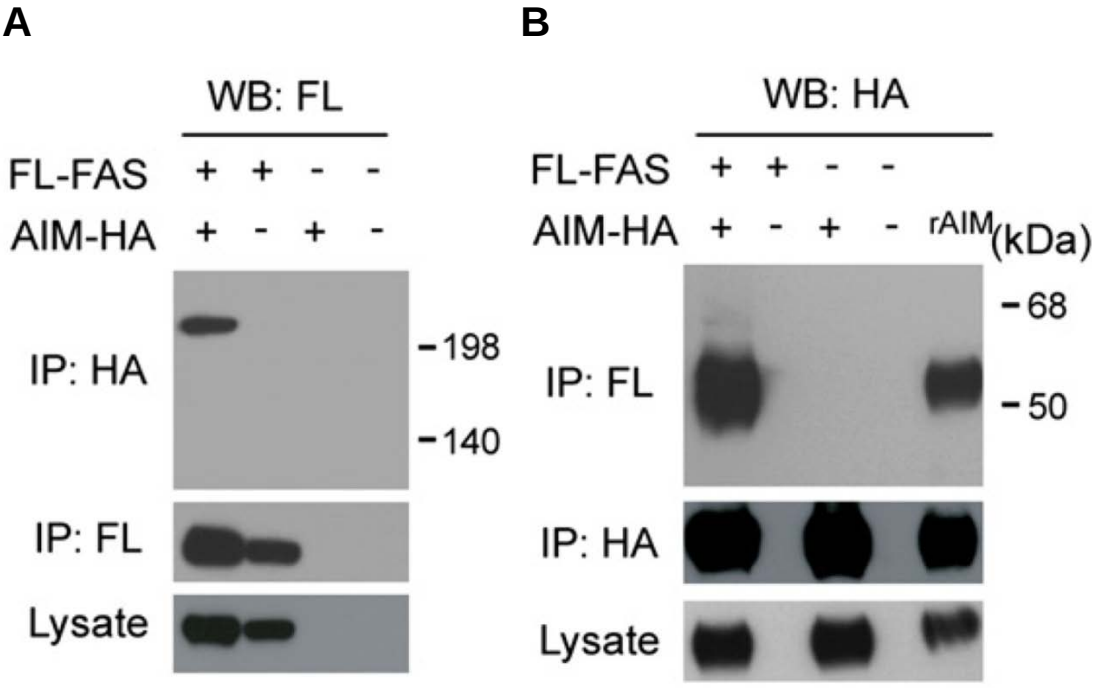


図 17　共免疫沈降法（co-IP）による FAS および AIM の相互作用解析

(A) AIM-HA による FLAG-FAS の免疫沈降。AIM-HA および FAS -FLAG を共発現させた HEK293T 細胞を用いて、AIM と FAS の相互作用を解析した。(B) FLAG-FAS による AIM-HA の免疫沈降。AIM と FAS の共沈が認められた。

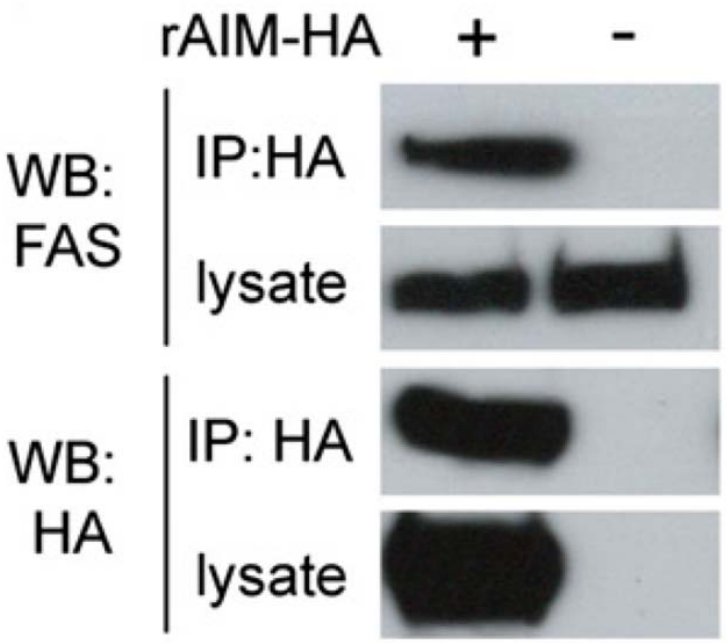


図 18　*in vivo* における FAS および AIM の相互作用解析

AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織に rAIM-HA を局所投与し、IP-WB により FAS との相互作用を解析した。*in vivo* においても FAS と AIM の共沈が認められた。

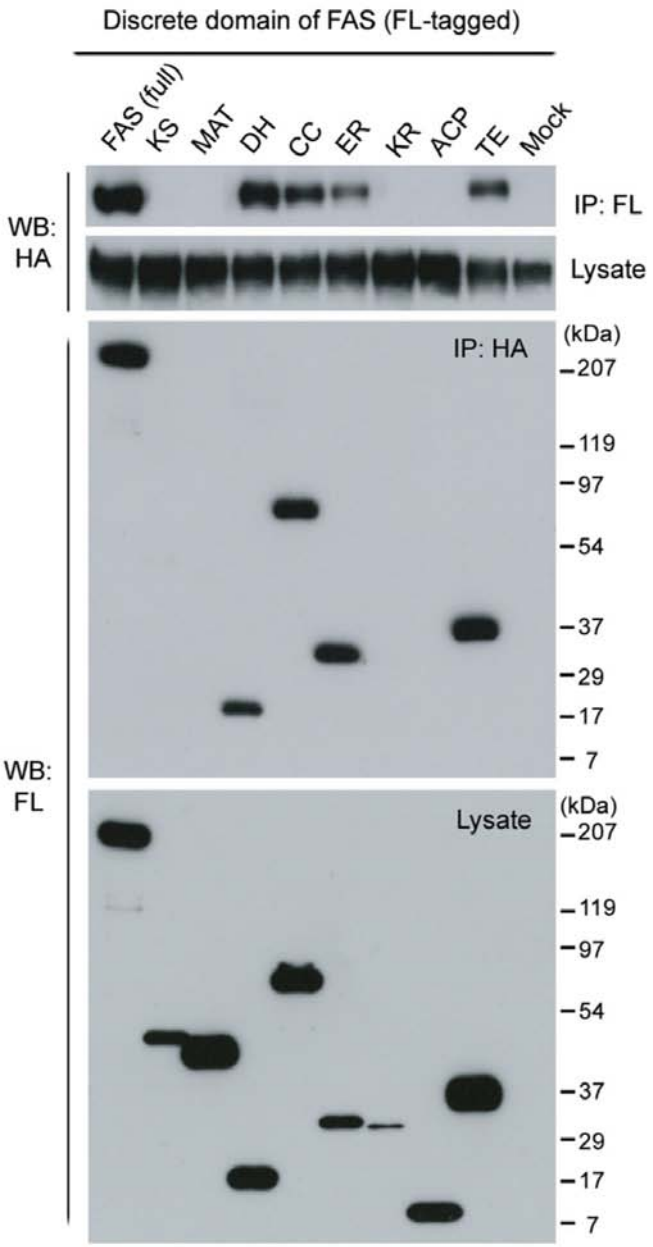


図 19　共免疫沈降法による AIM 相互作用部位の解析

AIM 安定発現細胞株（AIM-HA/HEK293T 細胞）に FAS の機能ドメイン部分を発現させ、co-IP により AIM の相互作用部位を解析した。AIM と FAS の DH ドメイン、CC ドメイン、ER ドメイン、TE ドメインとの共沈が認められた。AIM と KS ドメイン、MAT ドメイン、KR ドメイン、ACP ドメインとの共沈は認められなかった。FAS; fatty acid synthase, KS; ketoacyl synthase, MAT; malonyl/acetyl transferase, DH; dehydrase, CC; central core, ER; enoylreductase, KR; ketoreductase, ACP; acyl carrier protein, TE; tioesterase

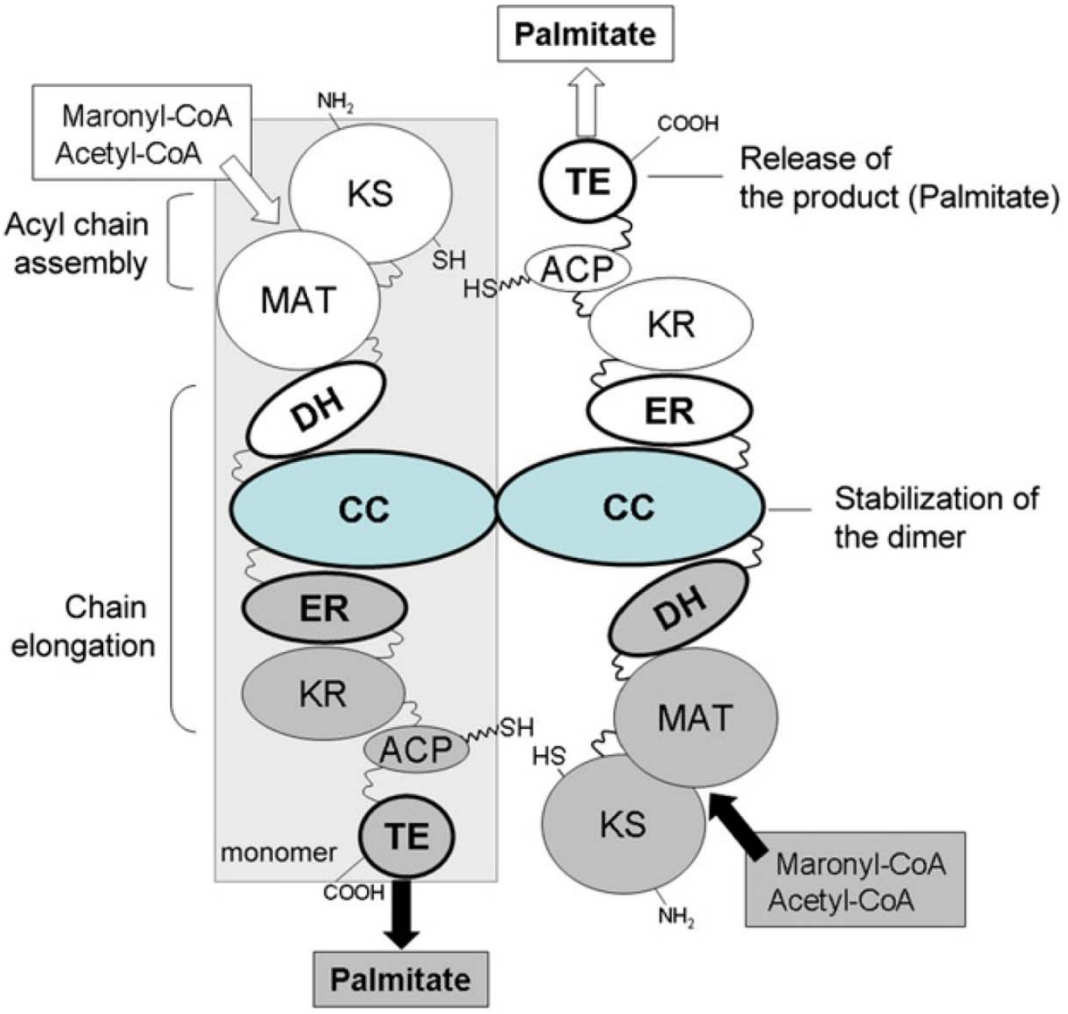


図 20　FAS における AIM 相互作用部位

AIM は FAS の DH ドメイン、CC ドメイン、ER ドメイン、TE ドメインに対して結合し作用する可能性がある（図中の太線表記部分）。CC ドメインは FAS の二量体構造の安定化に重要であり、DH ドメイン、ER ドメイン、TE ドメインは C16:0（パルミチン酸）合成時の炭素差延長に重要な部位であることから、AIM は FAS の酵素活性を構造的・機能的に阻害する可能性が示唆された。

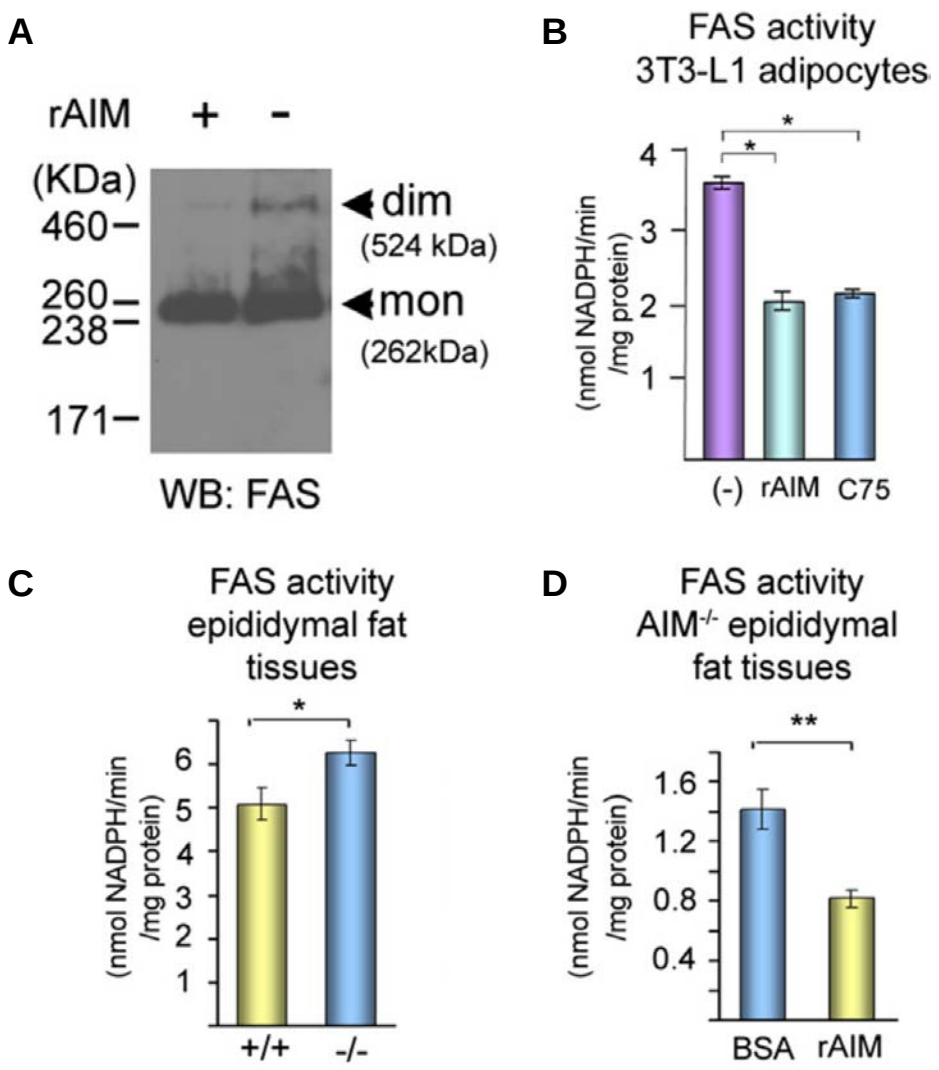


図 21　AIM は FAS インヒビターとして機能する

(A) AIM による FAS 二量体の減少。rAIM 処理により 3T3-L1 細胞の二量体 FAS（活性型 FAS）の減少が認められた。(B) FAS 酵素活性。rAIM 処理により 3T3-L1 細胞の FAS 酵素活性の阻害が認められた。rAIM による FAS 酵素活性阻害は、FAS 阻害剤 C75 と同程度であった。(C) 肥満 $AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスの脂肪組織における FAS 酵素活性。$AIM^{-/-}$マウスの脂肪組織では FAS 酵素活性の亢進が認められた。(D) rAIM 局所投与による FAS 酵素活性阻害効果。脂肪組織への rAIM 局所投与により、FAS 酵素活性の阻害が認められた。n = 3-6、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、rAIM: 5 μg/ml、C75: 25 μM、rAIM 投与量：100 μg

脂肪細胞において AIM と FAS 阻害剤 C75 は同様な効果を示す

前述したように、AIM は脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導することが示唆される。しかしながら、AIM と相互作用する分子が FAS 以外にも存在する可能性は否定できず、AIM の効果がそれら未知の分子によって引き起こされている可能性もある。そこで、脂肪細胞における AIM の効果が FAS 酵素活性の阻害によるものであるかを検討した。まず、rAIM および市販されている FAS 阻害剤 C75 により脂肪細胞を刺激し、培養上清中のグリセロール濃度および FFA 濃度を解析した。rAIM および C75 添加群では、非添加群と比較して培養上清中のグリセロール濃度ならびに FFA 濃度が有意に増加した（**図 22A**）。これらの結果から、C75 による FAS 酵素活性阻害においても AIM と同様に Lipolysis が誘導されることが示唆された。また、成熟脂肪細胞への分化初期段階において FAS 酵素活性を阻害することにより、成熟脂肪細胞への分化が顕著に抑制されることが報告されている［104, 106］。そこで、次に、分化誘導開始から 2 日間、rAIM を添加し、AIM の脂肪細胞分化抑制能について検討した。分化誘導 12 日後、Oil red O 染色による形態学的解析を行った。既報の C75 による効果と同様に rAIM においても Oil red O 染色陽性細胞数が著しく減少しており、成熟脂肪細胞への分化抑制が認められた（**図 22B**）。また、*pparγ2, c/ebpα, glut4* の遺伝子発現を定量 PCR により解析したところ、rAIM および C75 添加群では非添加群と比較して有意に

pparγ2、 *c/ebpα*、 *glut4* の発現が抑制されていた（**図 22C**）。なお、AIM の脂肪細胞分化抑制能は、分化誘導試薬の効果を減衰するものではなかった（**図 23**）。

これらの結果から、AIM と C75 は脂肪細胞に対して同様な効果を持つことが示唆された。また、AIM の脂肪細胞に対する効果は FAS 酵素活性の阻害に起因するものであることが示唆された。

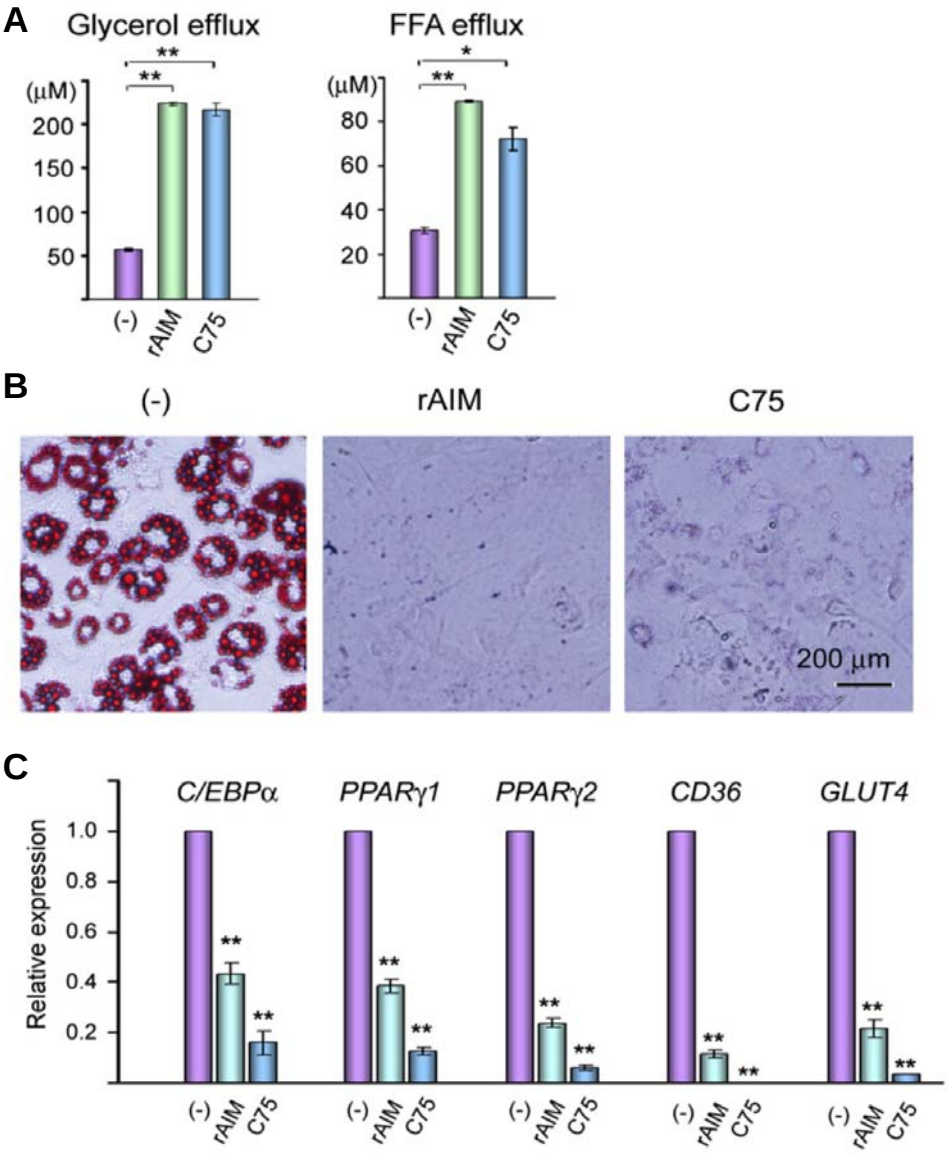


図 22 FAS 阻害剤 C75 と AIM は脂肪細胞に対して同様な効果を持つ

(A) 培養上清中のグリセロールおよび FFA 濃度。rAIM、C75 により処理した 3T3-L1 細胞では lipolysis が誘導され、培養上清中のグリセロールおよび FFA 濃度の上昇が認められた。(B) AIM および C75 による 3T3-L1 細胞の分化抑制効果。分化誘導開始時点において、rAIM、C75 により処理した 3T3-L1 細胞では成熟脂肪細胞への分化が顕著に抑制された。(C) 脂肪細胞マーカー遺伝子の発現解析。rAIM、C75 により処理した 3T3-L1 細胞では、脂肪細胞マーカー遺伝子（*c/ebpα, pparγ1, pparγ2, cd36, glut4*）の顕著な発現抑制が認められた。n = 3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、rAIM: 5 μg/ml、C75: 25 μM

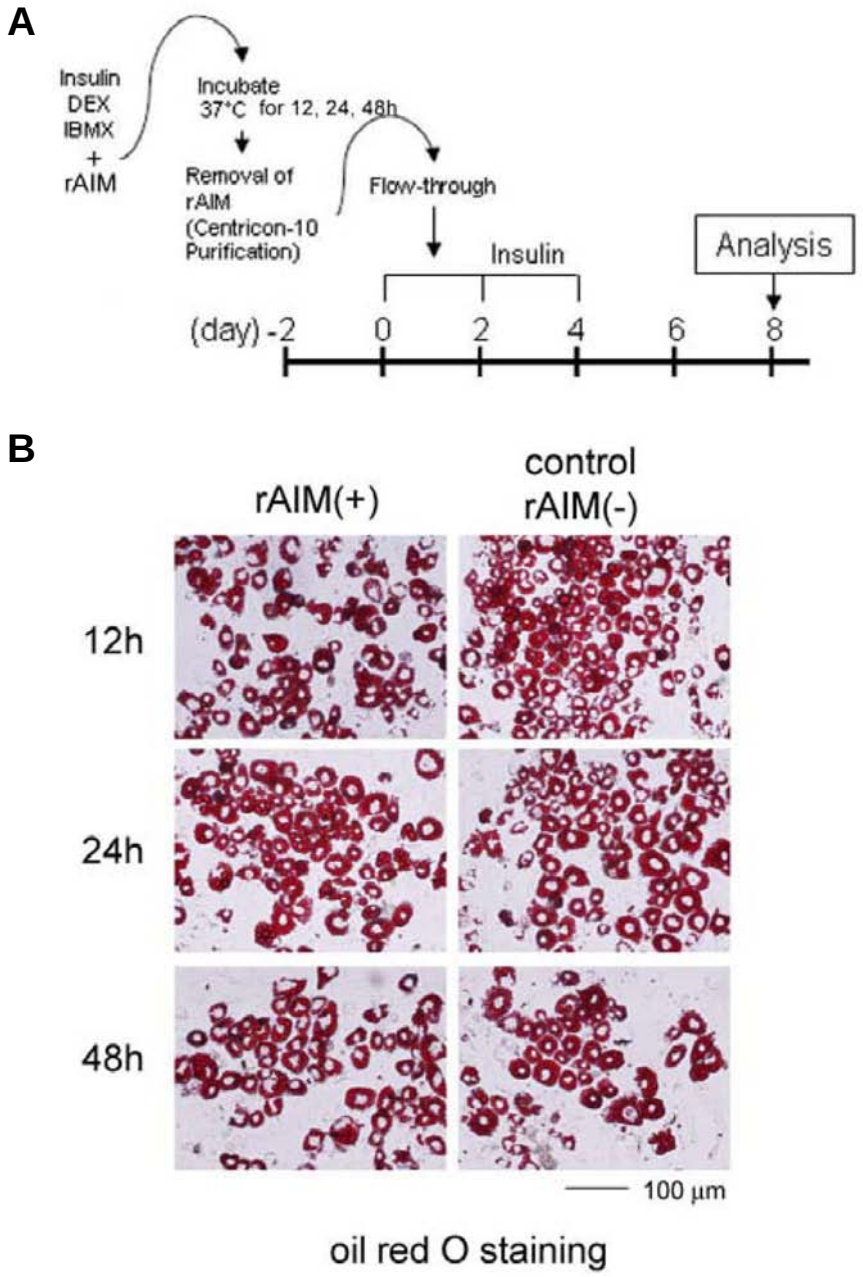


図 23　AIM は分化誘導試薬の効果を減衰させない

rAIM と誘導試薬を 37℃、12、24、48 時間の条件でインキュベートしたのち、限外濾過により rAIM を除去した。rAIM を除去した誘導試薬を用いて、3T3-L1 細胞を成熟脂肪細胞へと分化させたところ、rAIM 非添加の分化誘導試薬と同等の分化率が認められた。rAIM による脂肪細胞分化抑制効果は、rAIM による分化誘導試薬の非特異的吸着などによるものではないことが明らかとされた。

FAS 酵素活性阻害により誘導される Lipolysis は、cAMP 依存的な Lipolysis と作用機序が異なる

AIM および C75 による FAS 酵素活性阻害は脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する。しかしながら、FAS 酵素活性阻害により Lipolysis が誘導される機序についてはこれまで報告がない。そこで、FAS 酵素活性阻害による Lipolysis 誘導機構の解明を試みた。

一般的に、Lipolysis は外部からの栄養源が不足し、生体が飢餓状態にあるときに強く誘導される。これは、主にアドレナリンやノルアドレナリン（カテコールアミン）などのホルモン分泌が上昇することで、G タンパク質共役型受容体であるβ3 アドレナリン受容体を介した cAMP 依存的なシグナル伝達経路が活性化するためである。cAMP 依存的なシグナル伝達経路が活性化した結果、HSL (hormone-sensitive lipase) の活性化や ATGL (adipose triglyceride lipase) の発現量が増加し、Lipolysis が亢進される［108-111］。

FAS 酵素活性阻害が cAMP 依存的なシグナル伝達経路を活性化させる可能性を検討するため、脂肪細胞へ分化した 3T3-L1 を rAIM および C75 により刺激し、AMPK ならびに PKA のリン酸化を解析した。その結果、rAIM および C75 の刺激による AMPK ならびに PKA のリン酸化亢進は認められなかった（**図 24A, 24B**）。また、rAIM の刺激による *hsl* および *atgl* 遺伝子の発現変動を定量 PCR により解

析したところ、rAIM の刺激による *hsl* および *atgl* 遺伝子発現の亢進は認められなかった（**図 24C**）。

これらの結果から、脂肪細胞において FAS 酵素活性阻害により誘導される Lipolysis は、cAMP 依存的なシグナル伝達経路の活性化とは異なる機序によるものであると示唆された。

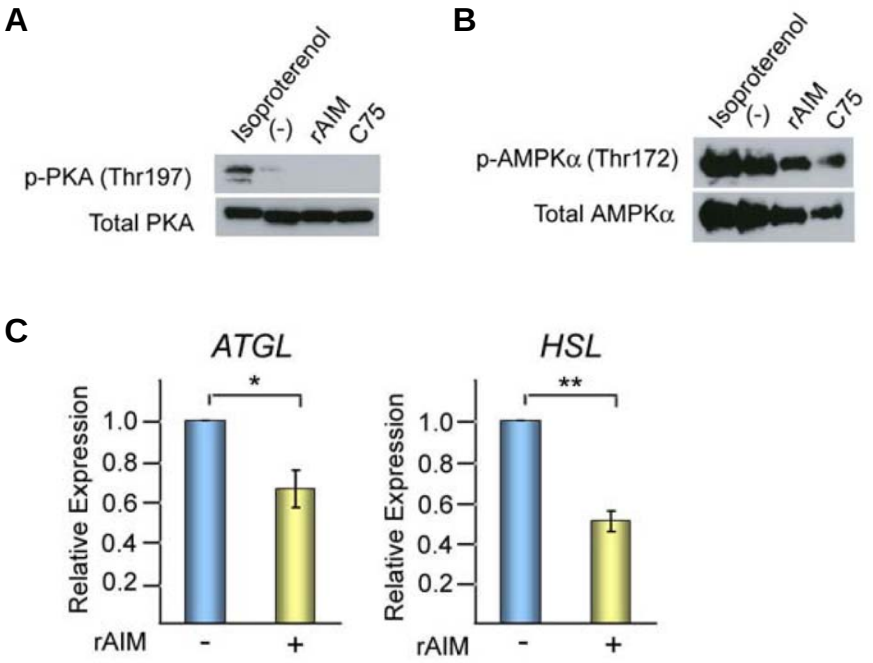


図 24 FAS 酵素活性阻害は cAMP 依存的 Lipolysis を誘導しない

(A) PKA の活性化。ポジティブコントロールとして isoproterenol を用いた。rAIM、C75 により処理した 3T3-L1 細胞では、PKA の活性化（Thr 197 のリン酸化）が認められない。(B) AMPK の活性化。ポジティブコントロールとして isoproterenol を用いた。 rAIM、C75 により処理した 3T3-L1 細胞では、AMPK の活性化（Thr 172 のリン酸化）が認められない。(C) *atgl* および *hsl* の発現。rAIM により処理した 3T3-L1 細胞では、*atgl* および *hsl* の遺伝子発現誘導が認められない。n = 3、平均±SEM、rAIM: 5 μg/ml、C75: 25 μM

脂肪細胞に対する AIM の新規機能

これまで AIM の脂肪細胞に対する効果は不明であった。しかし、本研究の結果から、AIM は、脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化を抑制する機能を持つこと、脂肪細胞に対し、Lipolysis を誘導し油滴を縮小する作用を持つことが明らかとなった。また、それらを支える分子メカニズムは、AIM が脂肪細胞に発現するスカベンジャー受容体 CD36 を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞内へ取り込まれ、細胞質に存在する FAS と結合し、構造的・機能的に酵素活性を阻害するためであることを明らかとした（**図 25**）。

これらの結果から、AIM はアポトーシス抑制能以外に、内在性 FAS インヒビターとしての機能を持ち、肥満に伴い増加する脂肪細胞の大きさを調整する生理的役割を持つことが示唆される。

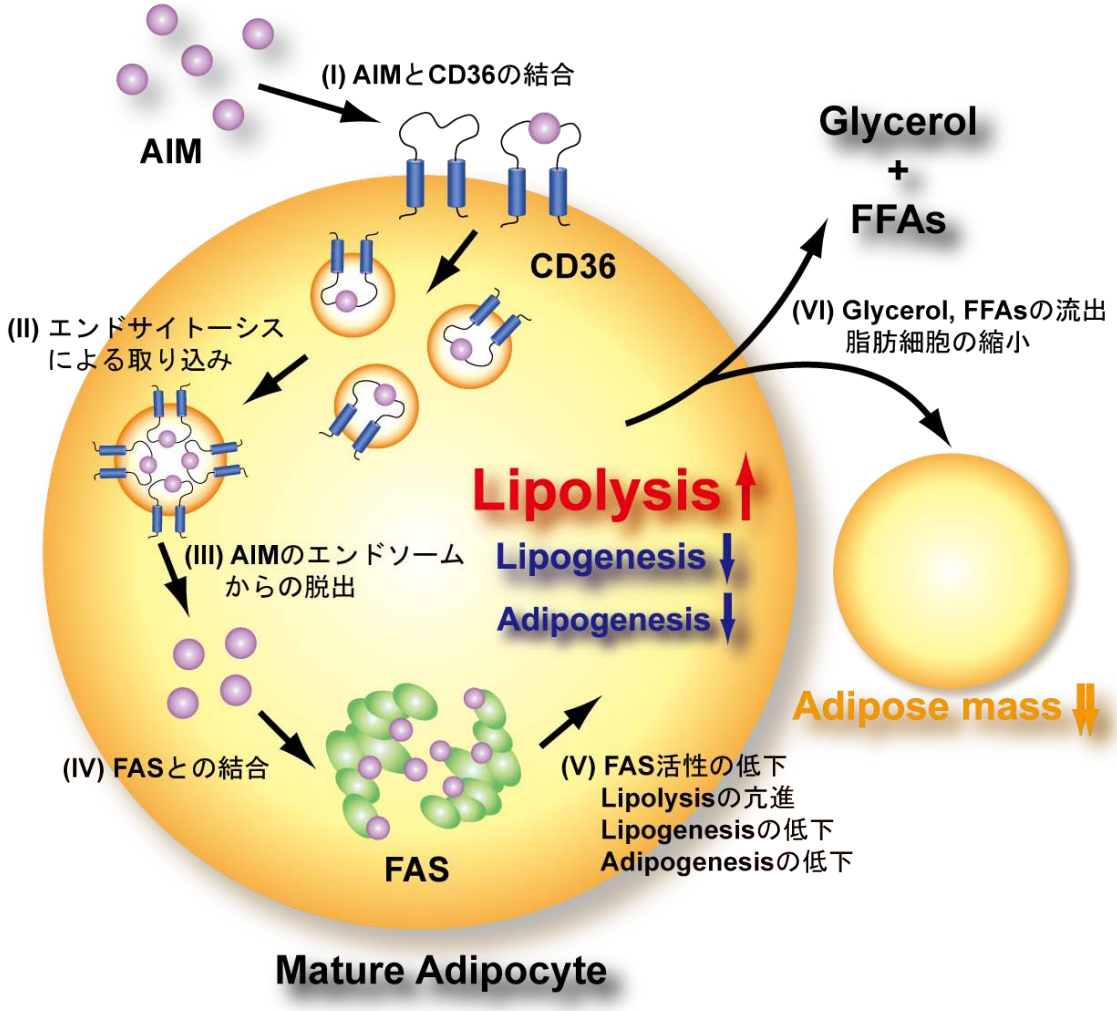


図 25　脂肪細胞に対する AIM の新規機能

（Ⅰ、Ⅱ）AIM は脂肪細胞表面に発現する CD36 と結合しエンドサイトーシスにより脂肪細胞内へ取り込まれる。（Ⅲ～Ⅴ）取り込まれた AIM は細胞質で FAS と結合し、構造的・機能的に FAS 酵素活性を阻害する。その結果、adipogenesis、lipogenesis が低下し lipolysis が亢進する。（Ⅵ）Lipolysis の亢進により油滴は TG (Ttiglyceride) からグリセロールと FFA に分解され、脂肪細胞外に流出する。これにより、脂肪細胞のサイズが減少する。すなわち、AIM はマクロファージに対するアポトーシス抑制能以外にも、脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する新たな機能を持つことが示唆された。

第 2 章　脂肪組織へのマクロファージ浸潤と慢性炎症の惹起における AIM の役割

メタボリックシンドロームの基盤病態であるインスリン抵抗性の惹起には、肥満した脂肪組織に浸潤・蓄積したマクロファージと脂肪組織を構成する細胞群との相互作用の結果として生じる慢性炎症が重要である［10-20］。

肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導する機構については不明であるが、近年、脂肪細胞の Lipolysis などにより放出されるパルミチン酸 (PA; palmitic acid) やステアリン酸 (SA; stearic acid) などの飽和脂肪酸が、肥満に伴うマクロファージ浸潤・蓄積に関与することが報告されている［20, 58, 59］。

第 1 章で述べたように、本研究の結果から、AIM は脂肪細胞に作用し Lipolysis を誘導する機能を持つことが明らかとなった。そこで、AIM による Lipolysis がメタボリックシンドロームの病態形成に重要な脂肪組織へのマクロファージ浸潤・蓄積にどのような影響を与えるか検討した。

AIM は肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤・蓄積に関与する

まず、$AIM^{+/+}$マウスおよび $AIM^{-/-}$マウスに HFD を 0、6、12 週間負荷し、体重、脂肪重量、血中グリセロール濃度、血中 FFA 濃度、血中 AIM 濃度について経時的に解析した。$AIM^{-/-}$マウスでは、$AIM^{+/+}$マウスと比較して HFD 負荷後 6 週間

までは体重および脂肪重量に有意な差は認められなかったが、HFD 負荷 12 週間では体重および脂肪重量が有意に増加していた（**図 26A**）。また、HFD 負荷前（HFD 0 週）の血中グリセロール濃度および血中 FFA 濃度については、両群ともに有意な差は認められなかったが、HFD 負荷 6 週以降、AIM$^{-/-}$マウスでは血中グリセロール濃度および血中 FFA 濃度の上昇が有意に抑制されていた（**図 26B**）。これらの結果から、AIM$^{-/-}$マウスは肥満し易いにも関わらず血中グリセロール濃度および血中 FFA 濃度が上昇しにくい表現型を持つと考えられる。

また、興味深いことに、HFD 負荷による肥満の亢進に伴い血中 AIM 濃度の上昇が認められた（**図 26C**）。

次に、HFD を 12 週間負荷した AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスにおける、脂肪組織へのマクロファージの浸潤を免疫組織化学により解析した。肥満 AIM$^{+/+}$マウスの脂肪組織では、M1 マクロファージマーカーである IL-6 陽性のマクロファージの浸潤と CLS の形成が認められたが、AIM$^{-/-}$マウスでは、AIM$^{+/+}$マウスより肥満が亢進しているにも関わらず、脂肪組織におけるマクロファージの浸潤がほとんど認められなかった（**図 27**）。また、M2 マクロファージマーカーである MR (mannose receptor) 陽性のマクロファージについては、両群ともに有意な差は認められなかった（**図 28**）。さらに、これらのマウスから、SVF (stromal-vascular cell fraction) を単離し、M1 マクロファージマーカー遺伝子(*cd11c*, *iNos*)および M2 マ

クロファージマーカー遺伝子（*cd163, MR, arginase*)の発現を定量 PCR により解析した。非肥満状態では、両群ともに M1 マクロファージマーカー遺伝子および M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現に有意な差は認められなかった（**図 29A, 29B**）。また、肥満 AIM$^{+/+}$マウスの SVF でのみ M1 マクロファージマーカー遺伝子の発現増加が認められた（**図 29A**）。さらに、肥満 AIM$^{+/+}$マウスの SVF では、AIM$^{-/-}$マウスの SVF と比較して M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現が有意に低下していた（**図 29B**）。これらの結果から、AIM$^{-/-}$マウスでは、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤が抑制されることが示唆された。

肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤が AIM の効果であることを検証するため、HFD を 12 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスに rAIM を 300 μg、週 3 回、静脈内投与、1 週間（投与期間）、の条件で連続投与し、脂肪組織へのマクロファージの浸潤を免疫組織化学により解析した。rAIM 投与群の脂肪組織では、BSA 投与群の脂肪組織と比較して、M1 マクロファージの浸潤が有意に増加していた（**図 30A, 30B**）。また、rAIM 投与群では BSA 投与群と比較して M1 マクロファージマーカー遺伝子の発現が有意に増加し、M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現が減少していた（**図 30C**）。さらに、非肥満状態の AIM$^{-/-}$マウスに対し、同様の条件で rAIM を投与し脂肪組織へのマクロファージの浸潤を免疫組織化学により解析した。rAIM 投与群の脂肪組織では、BSA 投与群の脂肪組織と比較

して、M1 マクロファージの浸潤が有意に増加していた（**図 31A, 31B**）。また、rAIM 投与群では BSA 投与群と比較して M1 マクロファージマーカー遺伝子の発現が有意に増加したが、*cd163* の発現を除き M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現に有意な差は認められなかった（**図 31C**）。これらの結果から、背景としての肥満の有無に関わらず、AIM は脂肪組織へのマクロファージの浸潤に関与することが示唆された。

AIM は脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する機能を持つ以外に、マクロファージのアポトーシスを抑制する機能を持つことが報告されている［75-77］。$AIM^{-/-}$ マウスで認められたマクロファージの浸潤とそれに続く蓄積の減少が、マクロファージのアポトーシスによるものである可能性を検討するため、TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 染色により脂肪組織におけるマクロファージのアポトーシスを評価した。$AIM^{+/+}$ および $AIM^{-/-}$ マウスの両群において、TUNEL 染色陽性細胞数に有意な差は認められなかった（**図 32**）。

したがって、$AIM^{-/-}$ マウスで認められた脂肪組織へのマクロファージの浸潤とそれに続く蓄積はマクロファージのアポトーシスによるものではない可能性が示唆された。

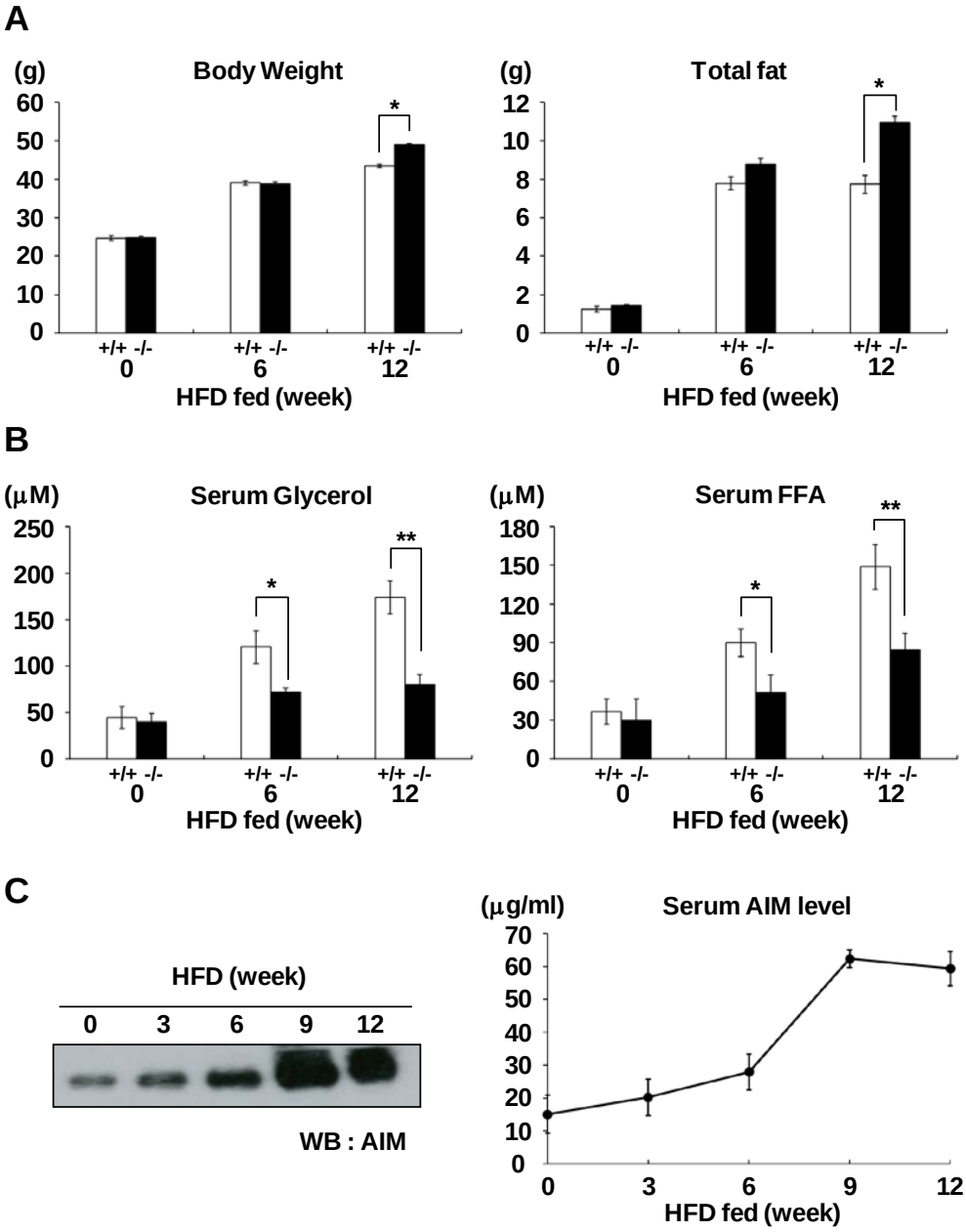


図 26 HFD 負荷 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスにおける経時的解析

HFD を 0、6、12 週間負荷した AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスの体重、脂肪重量、血中グリセロール濃度、血中 FFA 濃度、血中 AIM 濃度を解析した。AIM$^{-/-}$マウスは AIM$^{+/+}$ マウスと比較し、肥満し易いが血中 FFA 濃度が上昇しにくいことが明らかとなった。また、肥満の進行に伴い血中 AIM 濃度の上昇が認められた。(A) 体重および脂肪重量、(B) 血中グリセロールおよび血中 FFA 濃度、(C) HFD 負荷 AIM$^{+/+}$マウスの血中 AIM 濃度。n = 6-8、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01

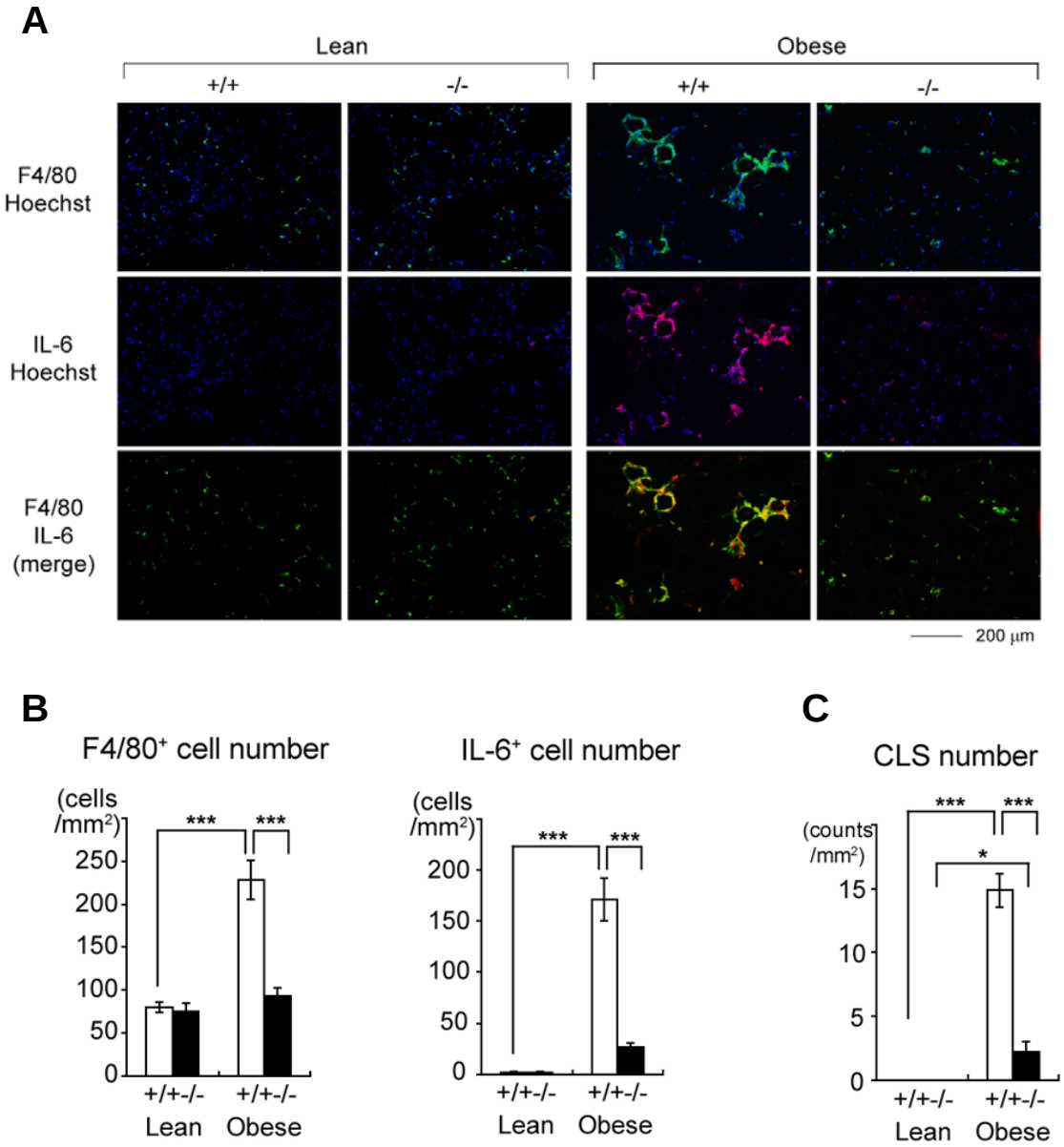
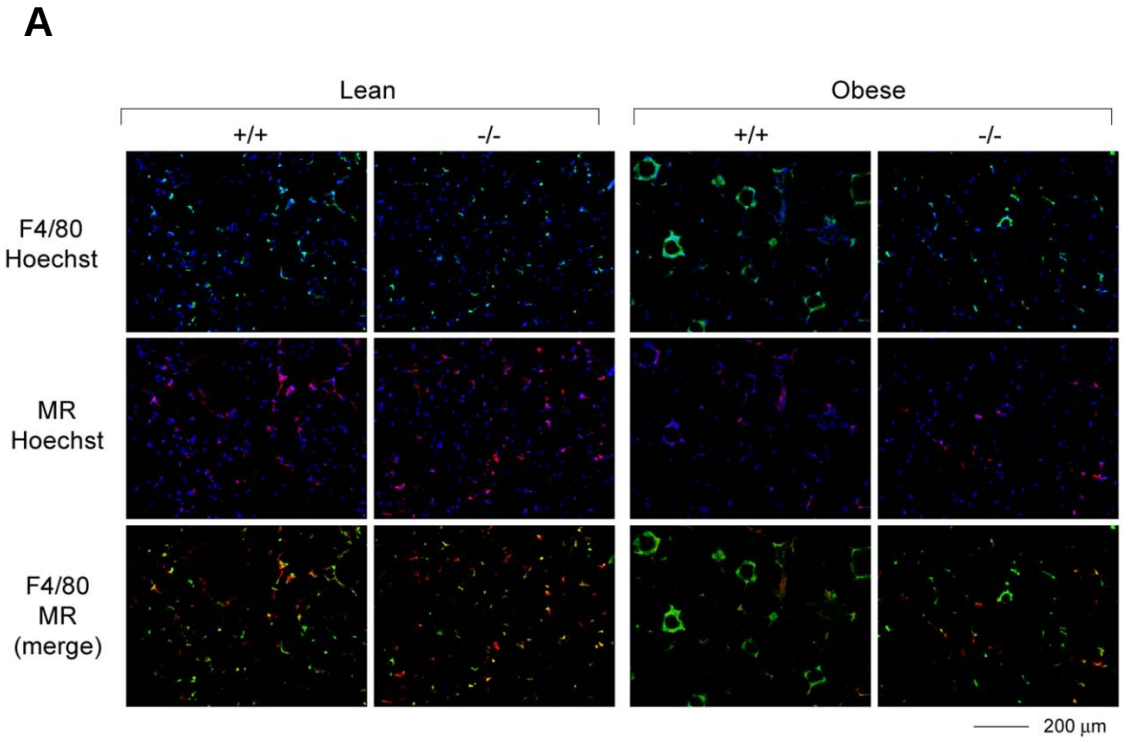


図 27　AIM$^{-/-}$マウスでは肥満に伴う M1 マクロファージ浸潤が抑制される

(A) 肥満脂肪組織における免疫組織化学染色像。マクロファージマーカー; F4/80（緑）、M1 マクロファージマーカー; IL6（赤）、核（青）。肥満 AIM$^{+/+}$マウスの脂肪組織では IL6 陽性である M1 マクロファージの浸潤が認められたが、肥満 AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織ではそれが認められなかった。(B) 全マクロファージ数および M1 マクロファージ数、(C) CLS 形成数。n =6-8、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01



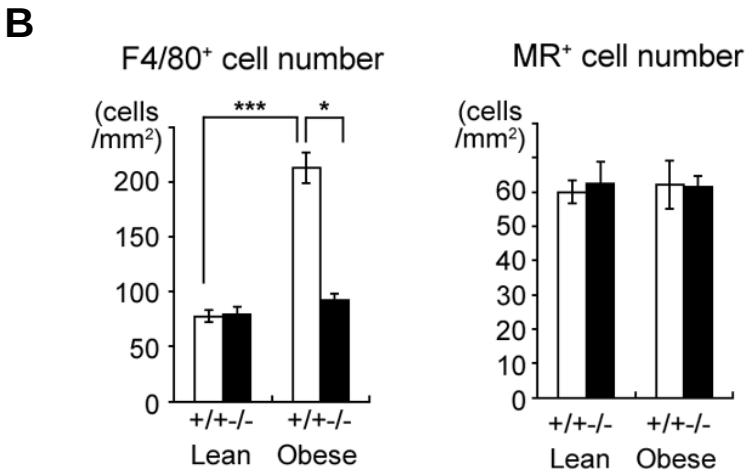


図 28 肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウス脂肪組織における M2 マクロファージ数の比較 (A) 肥満脂肪組織における免疫組織化学染色像。マクロファージマーカー; F4/80（緑）、M2 マクロファージマーカー; MR（赤）、核（青）。(B) 全マクロファージ数および M2 マクロファージ数。肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウス脂肪組織における M2 マクロファージの数に有意な差は認められなかった。n =6-8、平均±SEM

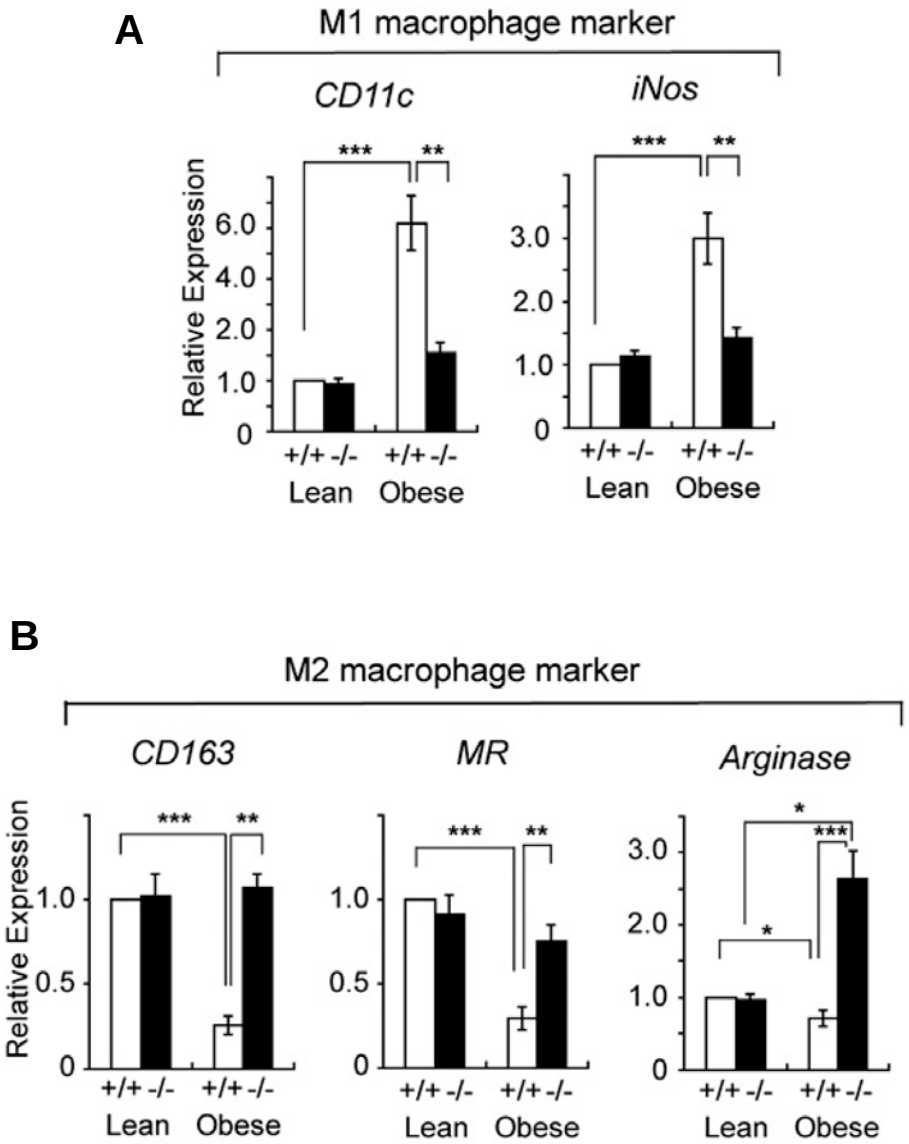


図 29　肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウス脂肪組織における M1 および M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現解析　(A) M1 マクロファージマーカー遺伝子の発現解析。肥満 AIM$^{+/+}$マウスの SVF でのみ、M1 マクロファージマーカー遺伝子（*cd11c, iNos*）の発現亢進が認められ、肥満 AIM$^{-/-}$マウスの SVF では遺伝子発現の亢進がほとんど認められなかった。(B) M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現解析。肥満 AIM$^{+/+}$マウスの SVF では、痩せている状態と比較して M2 マクロファージマーカー遺伝子（*cd163, MR, arginase*）発現の減少が認められたが、肥満 AIM$^{-/-}$マウスの SVF では遺伝子発現に有意な差は認められなかった。n =6-8、平均±SEM

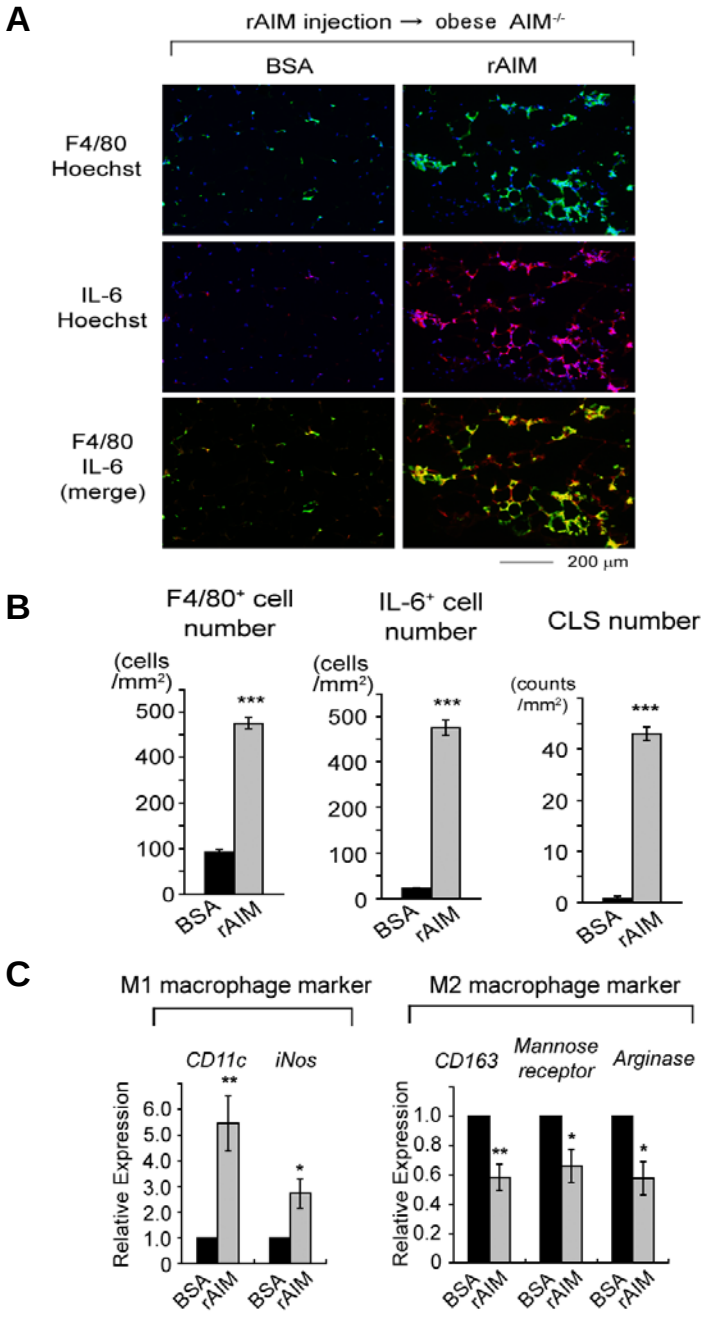


図 30 肥満 AIM$^{-/-}$マウスへの rAIM 投与により M1 マクロファージ浸潤が増大する

(A) 肥満脂肪組織における免疫組織化学染色像。マクロファージマーカー; F4/80（緑）、M1 マクロファージマーカー; IL6（赤）、核（青）。(B) マクロファージ数およびCLS形成数、(C) M1およびM2マクロファージマーカー遺伝子の発現。肥満 AIM$^{-/-}$マウスへの rAIM 投与により、脂肪組織への M1 マクロファージ浸潤の増大が認められた。n =6-8、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001、rAIM 投与量：300 μg

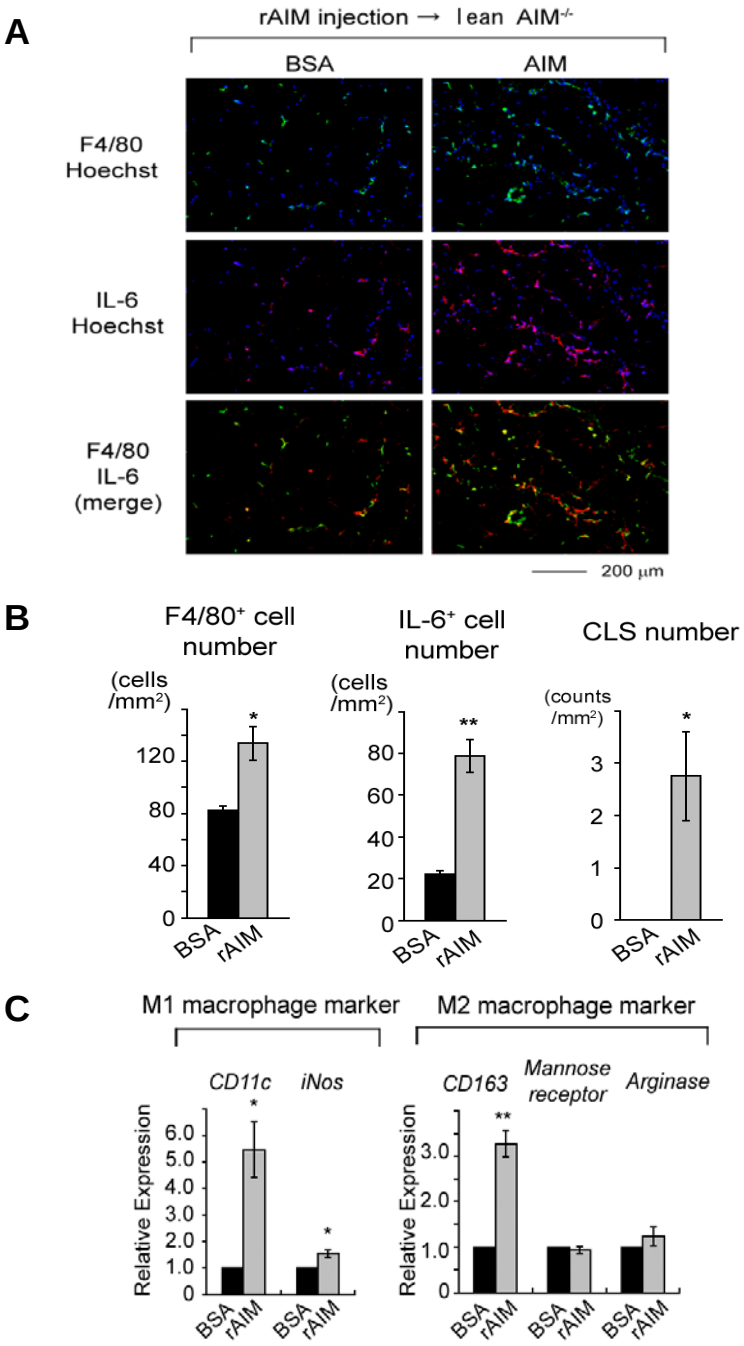


図 31　非肥満 AIM$^{-/-}$マウスへの rAIM 投与により M1 マクロファージ浸潤が増大する

(A) 非肥満脂肪組織における免疫組織化学染色像。マクロファージマーカー; F4/80（緑）、M1 マクロファージマーカー; IL6（赤）、核（青）。(B) マクロファージ数および CLS 形成数、(C) M1 および M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現解析。非肥満 AIM$^{-/-}$マウスへの rAIM 投与により、脂肪組織への M1 マクロファージ浸潤の増大が認められた。n =6-8、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、rAIM 投与量：300 μg

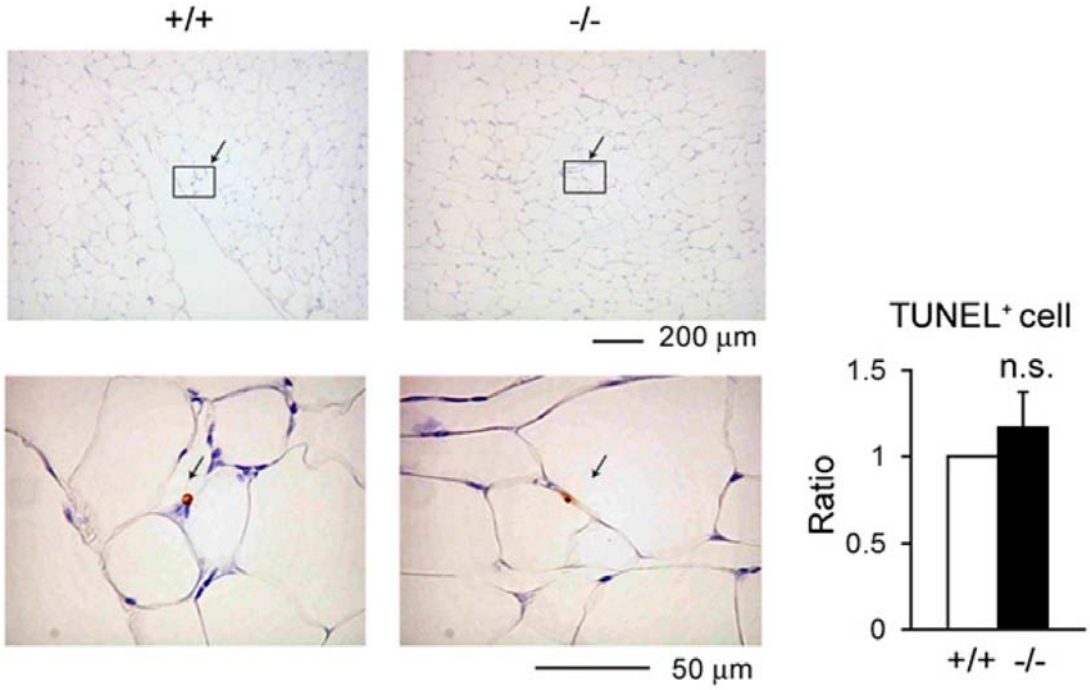


図 32　肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウス脂肪組織におけるマクロファージ浸潤の差はアポトーシス非依存的である

肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウス脂肪組織における TUNEL 染色陽性細胞数に有意な差は認められなかった。n =3-4、平均±SEM

AIM による Lipolysis は脂肪細胞において TLR シグナル伝達経路を活性化しケモカインの産生を亢進する

AIM は肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤に関与するが、これが AIM 自身によるものであるか、あるいは、AIM により Lipolysis を誘導された脂肪細胞によるものであるかは不明であった。この点を明らかにするため、AIM 自身および AIM により Lipolysis を誘導した脂肪細胞の培養上清におけるマクロファージ走化能を解析した。AIM や C75 自身にマクロファージ（RAW264.1 細胞）走化能は認められなかったが、成熟脂肪細胞へ分化した 3T3-L1 細胞を rAIM および C75 で 72 時間刺激して調製した conditioned medium (AIM-CM, C75-CM) には強いマクロファージ走化能が認められた（**図 33A**）。CD36 中和抗体により AIM の機能を阻害した conditioned medium (AIM + αCD36-CM)では、マクロファージ走化能が減少していた（**図 33B**）。また、αCD36 中和抗体自身にはマクロファージ走化能が認められなかった（**図 33B**）。これらの結果から、AIM 自身ではなく、AIM により脂肪細胞に誘導された Lipolysis がマクロファージ走化性に影響を与えることが示唆された。

次に、AIM により脂肪細胞に誘導された Lipolysis がどのようにマクロファージ走化性に影響を与えるのか検討した。脂肪細胞の Lipolysis により放出される PA や SA などの飽和脂肪酸は、脂肪細胞自身に発現する Toll 様受容体 2 または

4（TLR; toll like receptor）シグナル伝達経路を活性化させ、MCP-1 を含む様々なケモカイン産生を亢進させることが報告されている［58, 59］。この知見をもとに、AIM-CM、C75-CM により刺激した 3T3-L1 細胞における TLR シグナル伝達経路の活性化とケモカイン産生能を解析した。AIM-CM、C75-CM により刺激した 3T3-L1 細胞では、TLR シグナル伝達経路の活性化の指標となる IκBαの分解が認められた（**図 34**）。さらに、MCP-1、MCP-2、MCP-3、CCL5/RANTES (Chemokine (C-C motif) ligand 5 / Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) などのケモカイン遺伝子およびタンパク質の発現亢進が認められた（**図 35A, 35B**）。IκBαの分解およびケモカイン産生の亢進は、TLR2 および TLR4 のアダプタータンパク質である TIRAP (toll-interleukin-1 receptor domain containing protein) の阻害剤により抑制された（**図 35A, 35B**）。また、AIM-CM および C75-CM ではなく、AIM および C75 を単独で処理した 3T3-L1 細胞では IκBα の分解およびケモカインの産生亢進は認められなかった（**図 36A, 36B, 36C**）。さらに、AIM + αCD36-CM により処理した 3T3-L1 細胞では IκBαの分解およびケモカインの産生亢進が抑制された（**図 37A, 37B, 37C**）。脂肪細胞の Lipolysis により放出される PA や SA により処理した 3T3-L1 細胞では、IκBαの分解およびケモカイン遺伝子の発現亢進が認められ、これらは TIRAP 阻害剤により抑制された（**図 38A, 38B**）。

これらの結果から、AIM による Lipolysis は、脂肪細胞において TLR シグナル伝達経路を活性化させ、ケモカインの産生を亢進させることにより脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導することが示唆された。

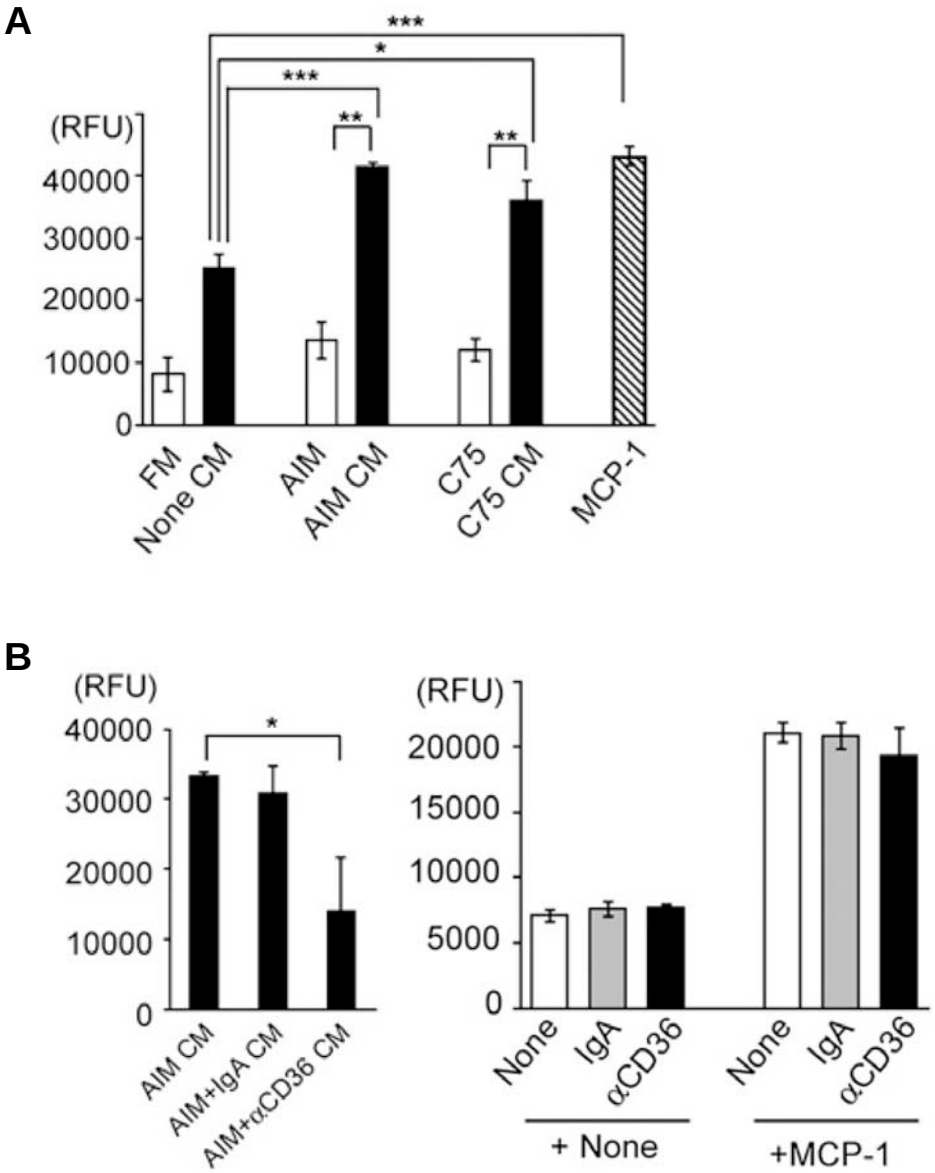


図 33　AIM による Lipolysis はマクロファージの走化性を活性化させる

(A) 各種 CM、rAIM 単独、C75 単独による RAW264.1 細胞の走化性。(B)CD36 中和抗体による AIM 機能阻害効果。rAIM および C75 単独では RAW264.1 細胞の走化性に影響を与えないが、3T3-L1 細胞に作用させて調整した CM では RAW264.1 細胞の走化性を活性化させた。CD36 中和抗体により AIM CM の効果減少が認められた。また、CD36 中和抗体単独では RAW264.1 細胞の走化性に影響を与えなかった。MCP-1 をポジティブコントロールとして用いた。n =4、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001

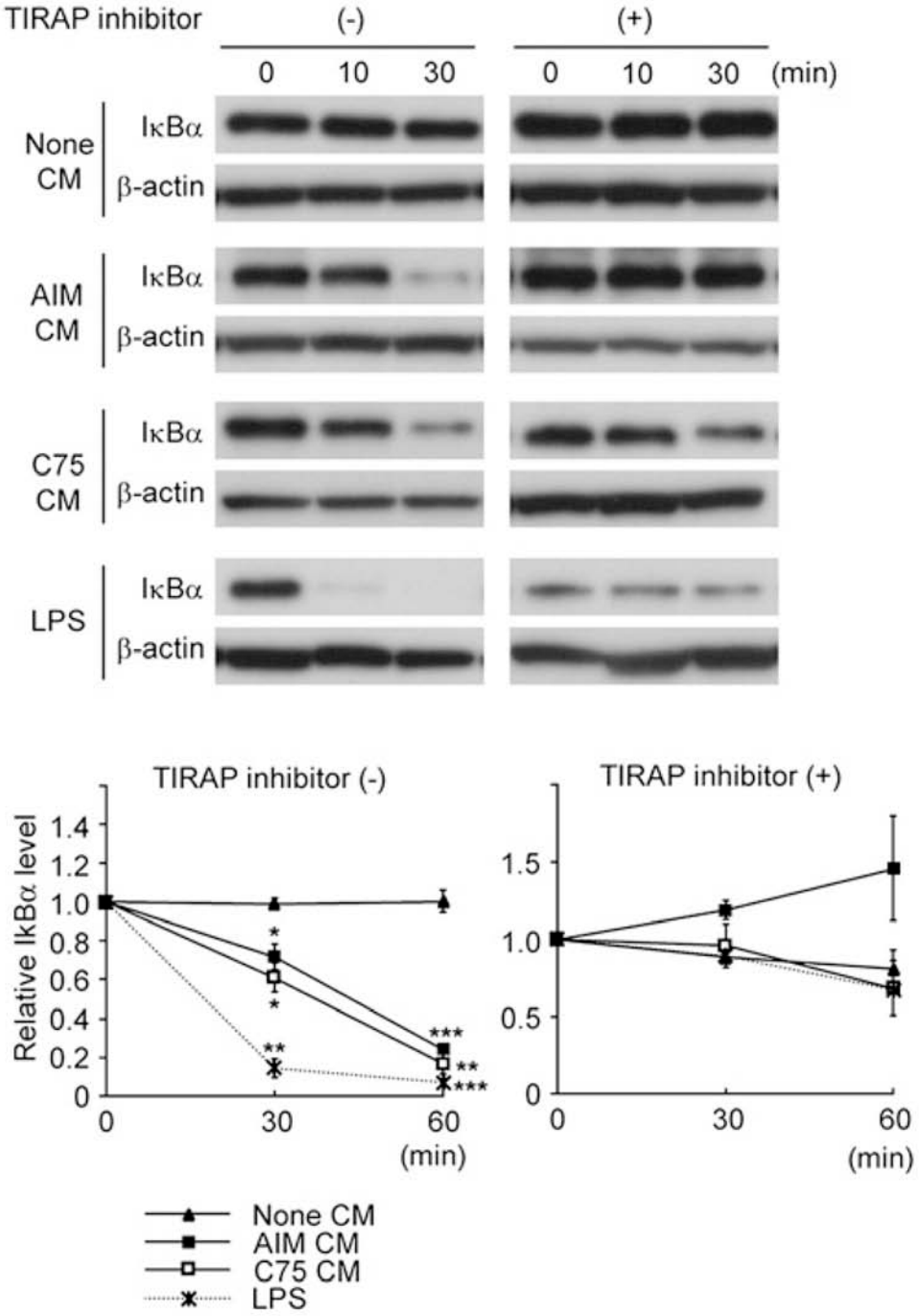


図 34　AIM による Lipolysis は脂肪細胞において TLR4 シグナル伝達経路を活性化する　AIM-CM および C75-CM により処理した 3T3-L1 細胞では、IκBαの分解が認められた。また、IκBαの分解は TIRAP 阻害剤の存在下で抑制された。ポジティブコントロールとして LPS を用いた。n =3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001

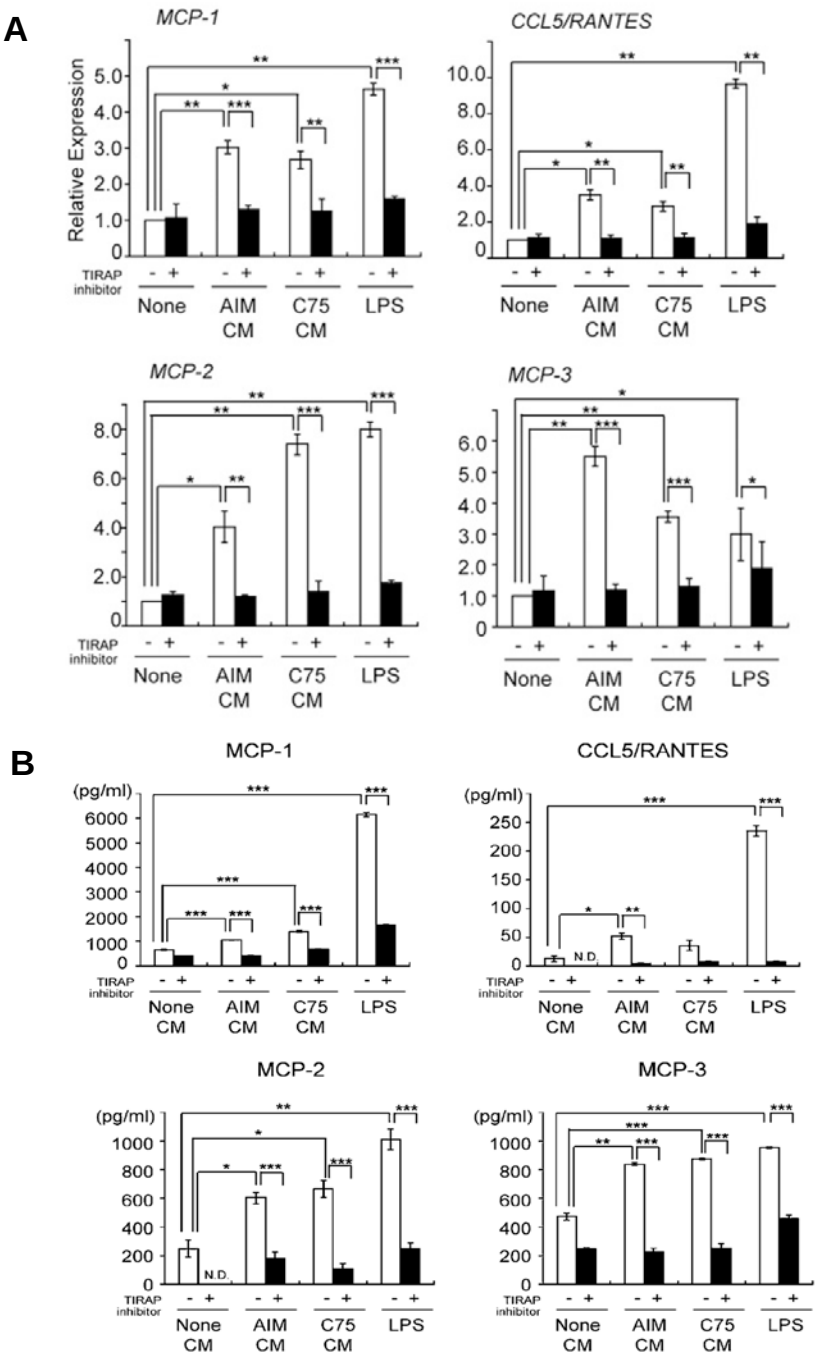


図 35　AIM による Lipolysis は脂肪細胞におけるケモカイン産生を促進する

(A) ケモカイン遺伝子（*mcp-1, mcp-2, mcp-3, ccl5/rantes*）の発現、(B) 培養上清中の各種ケモカイン濃度。AIM-CM および C75-CM により処理した 3T3-L1 細胞では、各種ケモカイン産生の亢進が認められた。また、これらは TIRAP 阻害剤の存在下で抑制された。ポジティブコントロールとして LPS を用いた。n =3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001

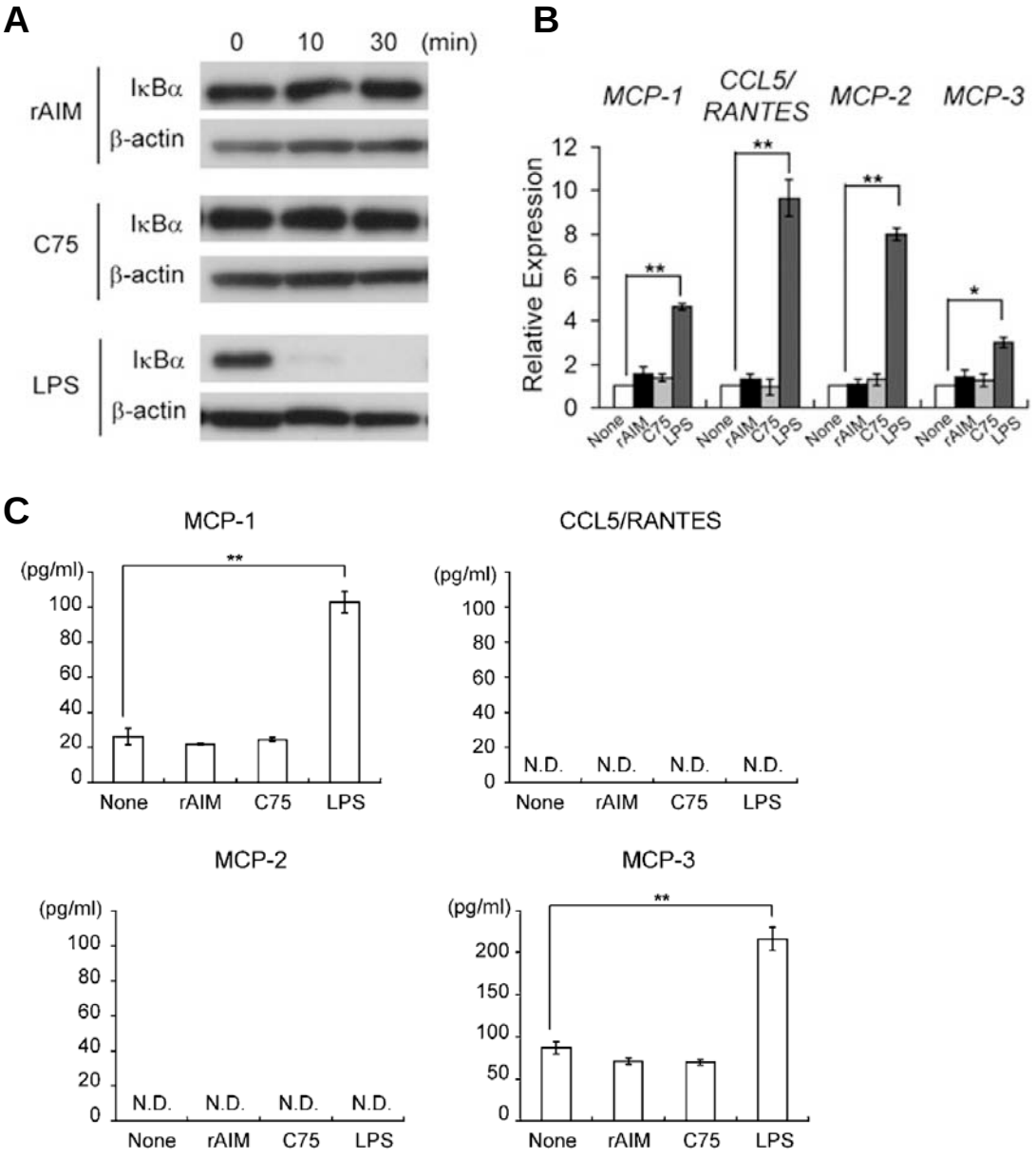


図 36　AIM および C75 単独ではケモカイン産生に影響を与えない

(A) rAIM、C75 単独処理による、IκBαの分解、(B) ケモカイン遺伝子の発現、(C) 培養上清中の各種ケモカイン濃度。rAIM および C75 単独処理では、TLR4 シグナル伝達経路の活性化やケモカイン産生亢進が認められない。n =3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、rAIM: 25 μg/ml、C75: 25 μM

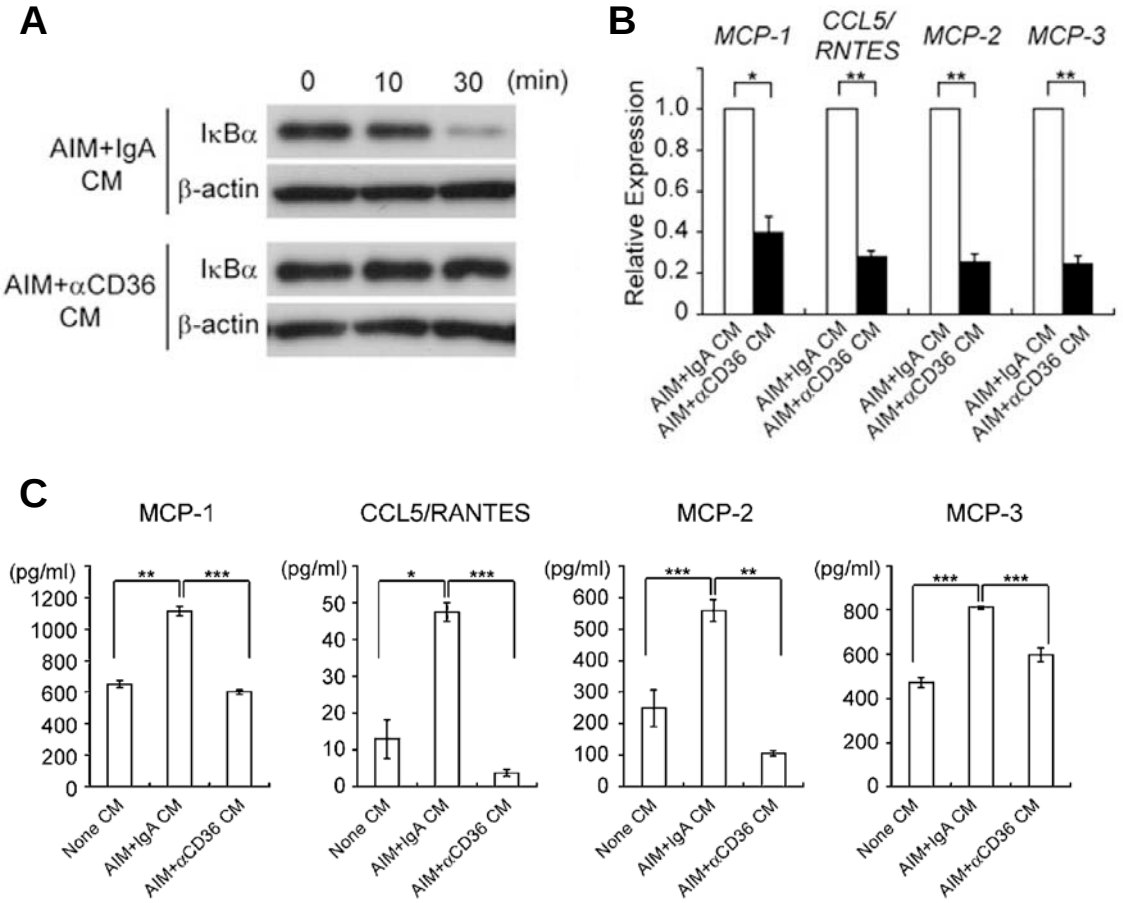


図 37　CD36 中和抗体による AIM 機能阻害効果

(A) IκBαの分解 、(B) ケモカイン遺伝子の発現、(C) 培養上清中の各種ケモカイン濃度。CD36 中和抗体を作用させて調整した AIM-CM では、TLR4 シグナル伝達経路の活性化やケモカイン産生亢進が抑制された。n =3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001

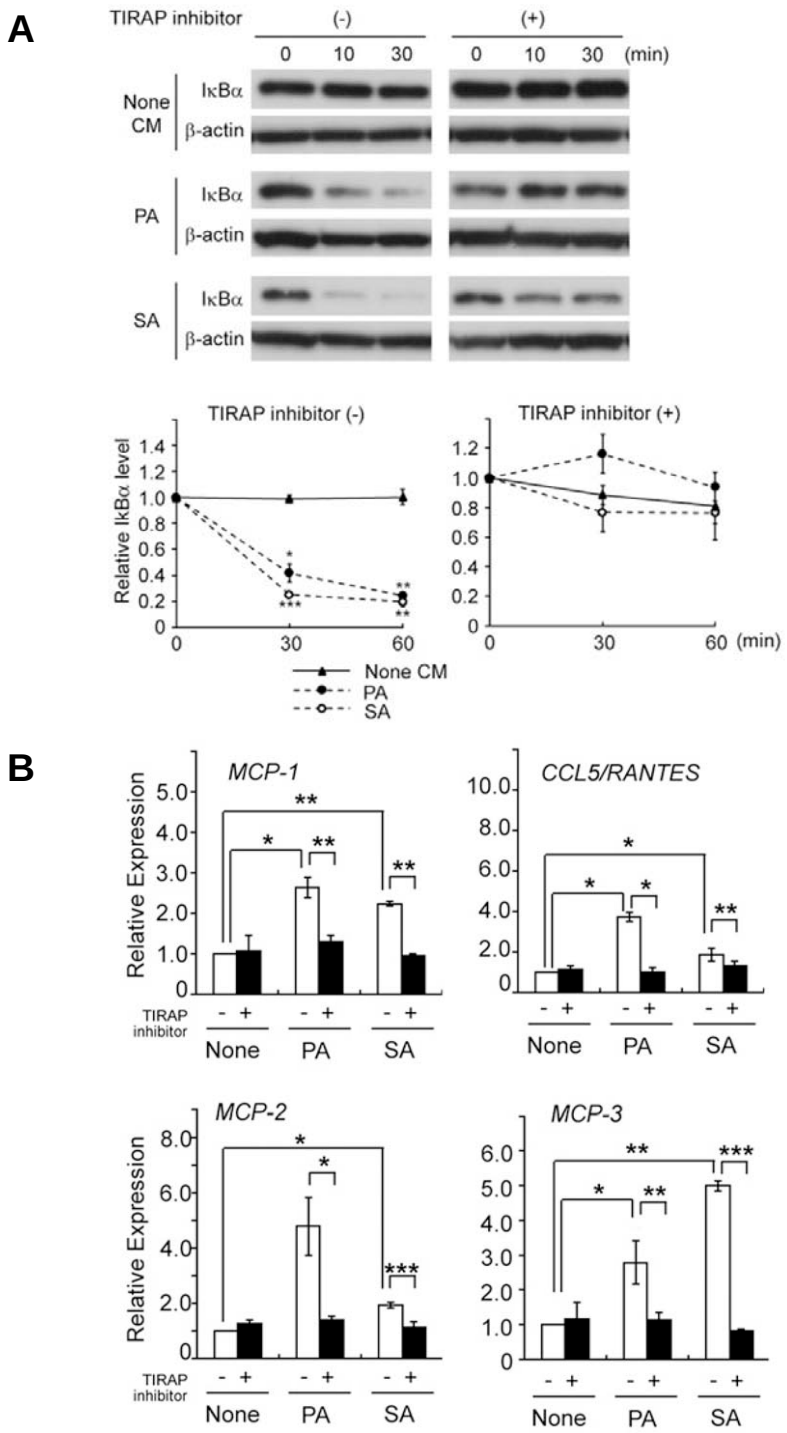


図 38 PA および SA 刺激による脂肪細胞のケモカイン産生亢進効果

(A) IκBαの分解 、(B) ケモカイン遺伝子の発現。PA および SA により刺激された脂肪細胞では、TLR4 シグナル伝達経路の活性化やケモカイン産生亢進が認められた。n =3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001、PA: 100 μM、SA: 100 μM

AIM による Lipolysis 亢進に伴うケモカインの産生は TLR4 を介する

TIRAP 阻害剤を用いた検討から、AIM による Lipolysis は、脂肪細胞の TLR シグナル伝達経路を活性化することを明らかとした。しかしながら、TIRAP は、TLR4 だけではなく TLR2 の下流においても機能することが知られている[112]。そこで、AIM による Lipolysis に伴うケモカイン産生の亢進が TLR4 を介したものであるかどうか検討した。

成熟脂肪細胞へと分化した 3T3-L1 細胞に発現する TLR4 を siRNA によりノックダウンし、AIM-CM による MCP-1 の産生亢進を評価した。3T3-L1 細胞における *tlr4* 遺伝子発現抑制率は約 80%であり、AIM-CM による MCP-1 の産生亢進は有意に抑制された（**図 39A, 39B**）。

in vivo における TLR4 の関与を明確に示すため、$TLR4^{+/+}$および $TLR4^{-/-}$マウスに rAIM を 300 μg、週 3 回、1 週間（投与期間）の条件で連続投与し、Lipolysis の誘導および脂肪組織へのマクロファージの浸潤について解析した。

$TLR4^{+/+}$および $TLR4^{-/-}$マウスの双方において、rAIM 投与群では、BSA 投与群と比較して、脂肪組織における *fsp27*、*perilipin*、*adipophilin* の遺伝子発現が有意に抑制されており、血中グリセロール濃度および血中 FFA 濃度は有意に上昇していた（**図 40A, 40B**）。これらの結果から、$TLR4^{-/-}$マウスにおいても、AIM により Lipolysis が誘導されることが示唆された。

また、脂肪組織におけるケモカイン遺伝子の発現亢進について定量 PCR により解析した。TLR4$^{-/-}$マウスでは、rAIM 投与により Lipolysis が誘導されているにも関わらず、脂肪組織におけるケモカイン遺伝子の発現誘導が認められなかった（**図 41**）。この際、TLR4$^{-/-}$マウスでは、TLR シグナル伝達経路の活性化の指標となる c-JNK (c-Jun N-terminal kinase) のリン酸化が認められなかった（**図 42**）。

さらに、rAIM 投与群のうち、TLR4$^{+/+}$マウスでは脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤および蓄積が認められたが、TLR4$^{-/-}$マウスでは認められなかった（**図 43**）。脂肪組織における M1 マクロファージマーカー遺伝子および M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現を定量 PCR により解析したところ、rAIM 投与群のうち、TLR4$^{+/+}$マウスでは M1 マクロファージマーカー遺伝子の発現亢進が認められたが、TLR4$^{-/-}$マウスでは認められなかった（**図 44A**）。また、両群ともに M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現に有意な差は認められなかった（図 44B）。

さらに、HFD を 12 週間負荷した AIM$^{+/+}$マウスおよび AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織において、c-JNK のリン酸化およびケモカイン遺伝子の発現を解析した。AIM$^{-/-}$マウスでは AIM$^{+/+}$マウスと比較して、脂肪組織における c-JNK のリン酸化が有意に抑制されていた（**図 45**）。また、AIM$^{-/-}$マウスでは脂肪組織におけるケモカイン遺伝子の発現および血中 MCP-1 濃度の上昇が有意に抑制されていた（**図**

46A, 46B）。

これらの結果から、AIM による Lipolysis 亢進に伴うケモカイン産生の増加は、TLR4 を介することが強く示唆された。

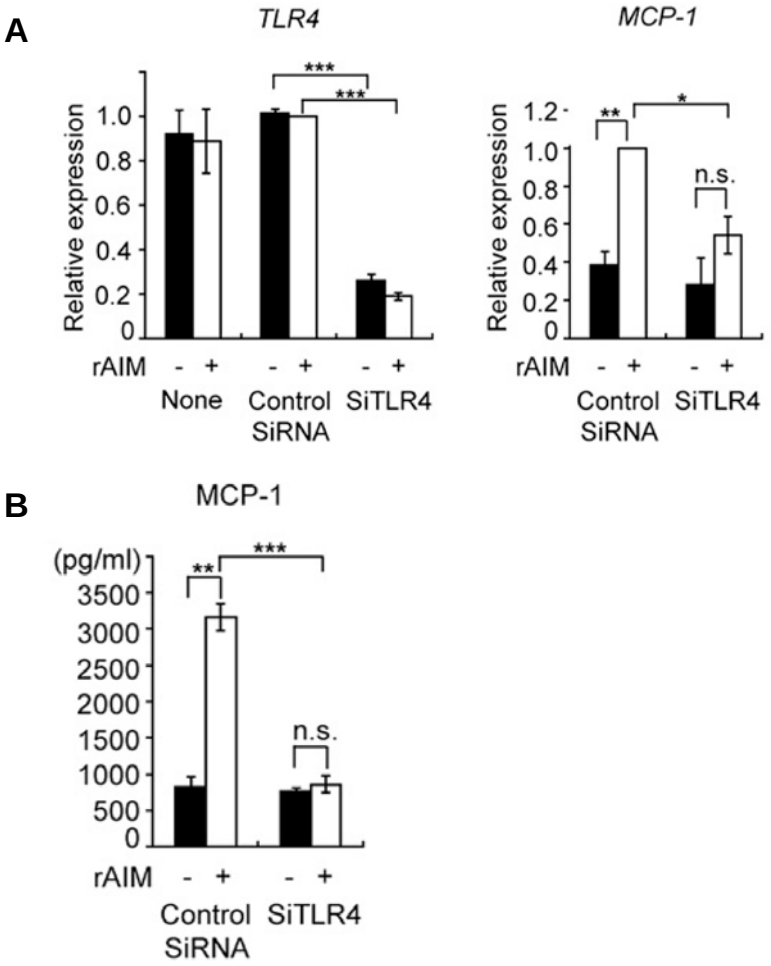


図 39 *tlr4* 遺伝子発現の抑制がケモカイン産生亢進に与える影響

(A) *tlr4* および *mcp-1* 遺伝子発現、(B) 培養上清中の MCP-1 濃度。siRNA による *tlr4* 遺伝子発現の抑制により、Lipolysis に伴うケモカインの産生亢進が抑制された。n =3、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001、rAIM:25 μg/ml

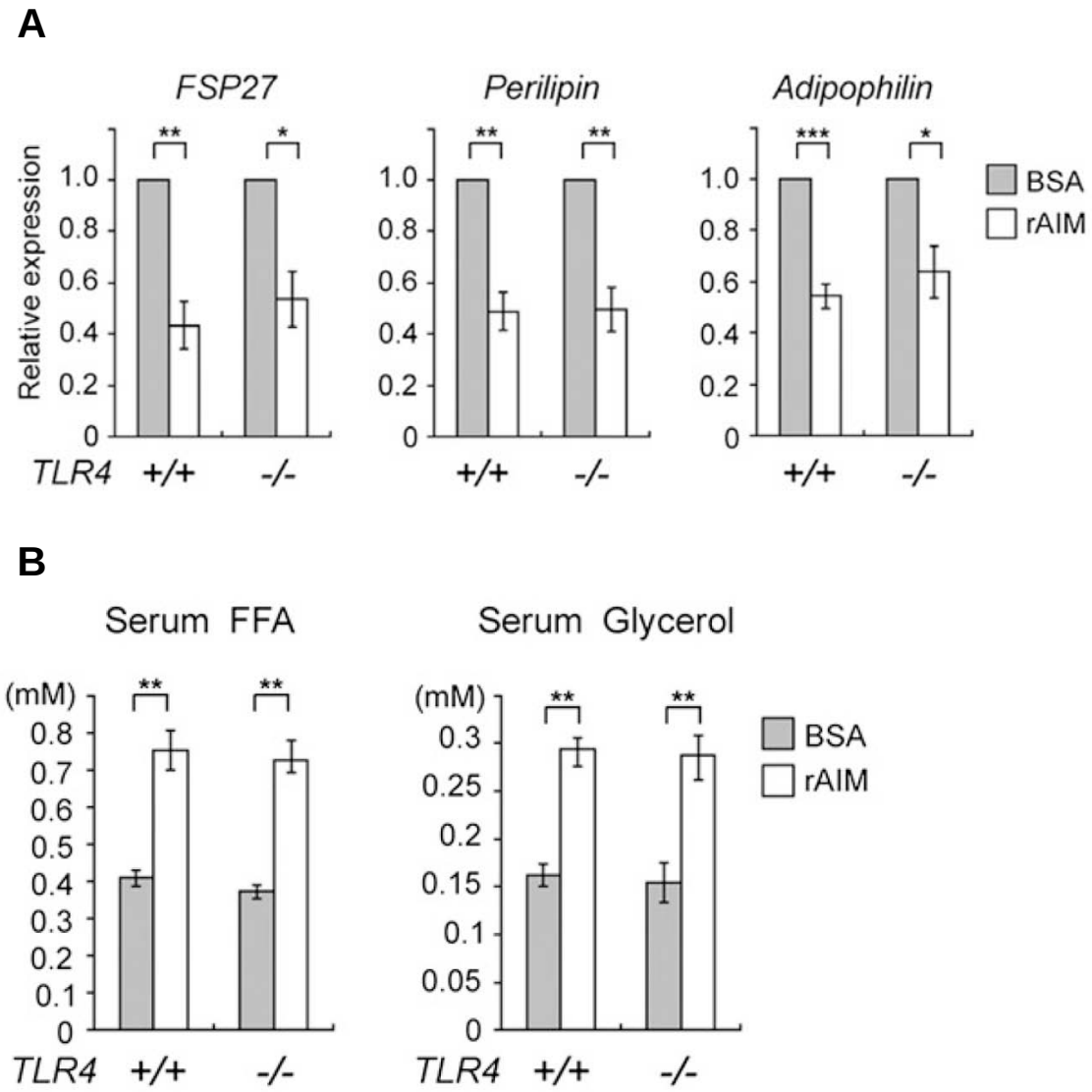


図 40 TLR4$^{-/-}$マウスにおける AIM 誘導性 Lipolysis の検討

(A) 油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現、(B) 血中グリセロールおよび血中 FFA 濃度。TLR4$^{+/+}$および TLR4$^{-/-}$マウスの双方において、rAIM 投与群では、油滴構成タンパク質関連遺伝子の発現抑制、血中グリセロールおよび血中 FFA 濃度の上昇が認められた。n =5、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001、rAIM 投与条件：300 μg/週 3 回/1 週間（投与期間）

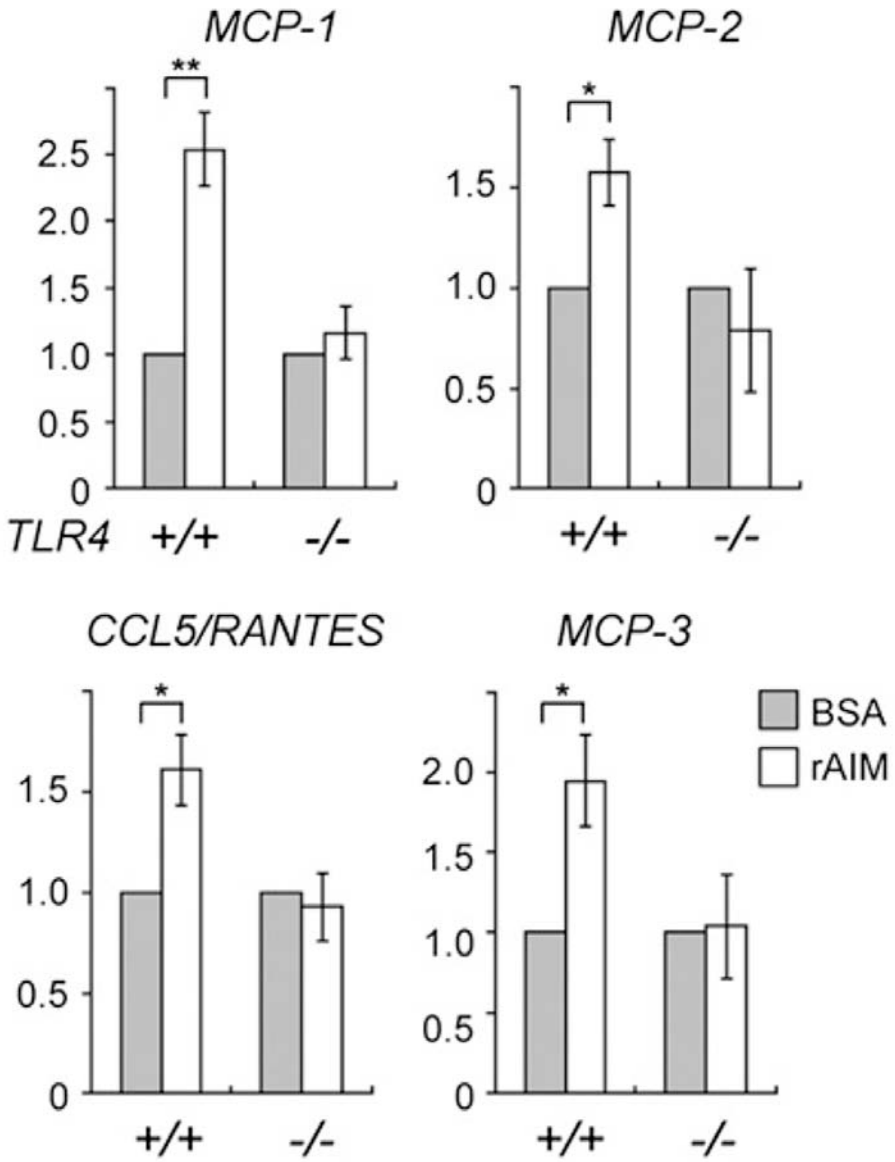


図 41　TLR4$^{-/-}$マウスの脂肪組織ではLipolysisによるケモカイン遺伝子の発現が抑制される　rAIM 投与群のうち、TLR4$^{+/+}$マウスでのみ脂肪組織におけるケモカイン遺伝子（*mcp-1, mcp-2, mcp-3, ccl5/rantes*）の発現亢進が認められた。TLR4$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、この応答は認められなかった。n =5、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、rAIM 投与条件：300 μg/週 3 回/1 週間（投与期間）

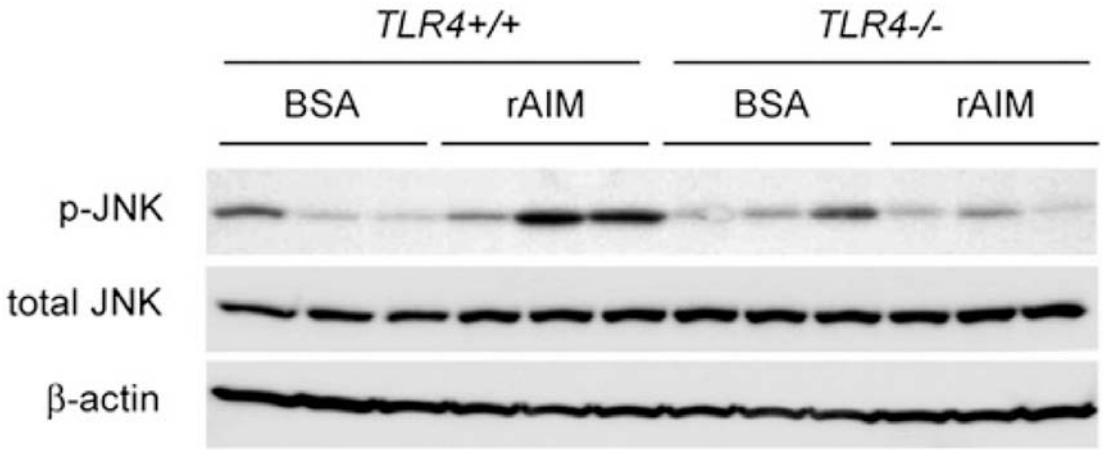


図 42　TLR4$^{-/-}$マウスの脂肪組織では AIM 投与による JNK のリン酸化が抑制される
rAIM 投与群のうち、TLR4$^{+/+}$マウスでのみ脂肪組織における JNK のリン酸化亢進が認められた。TLR4$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、この応答は認められなかった。
rAIM 投与条件：300 μg/週 3 回/1 週間（投与期間）

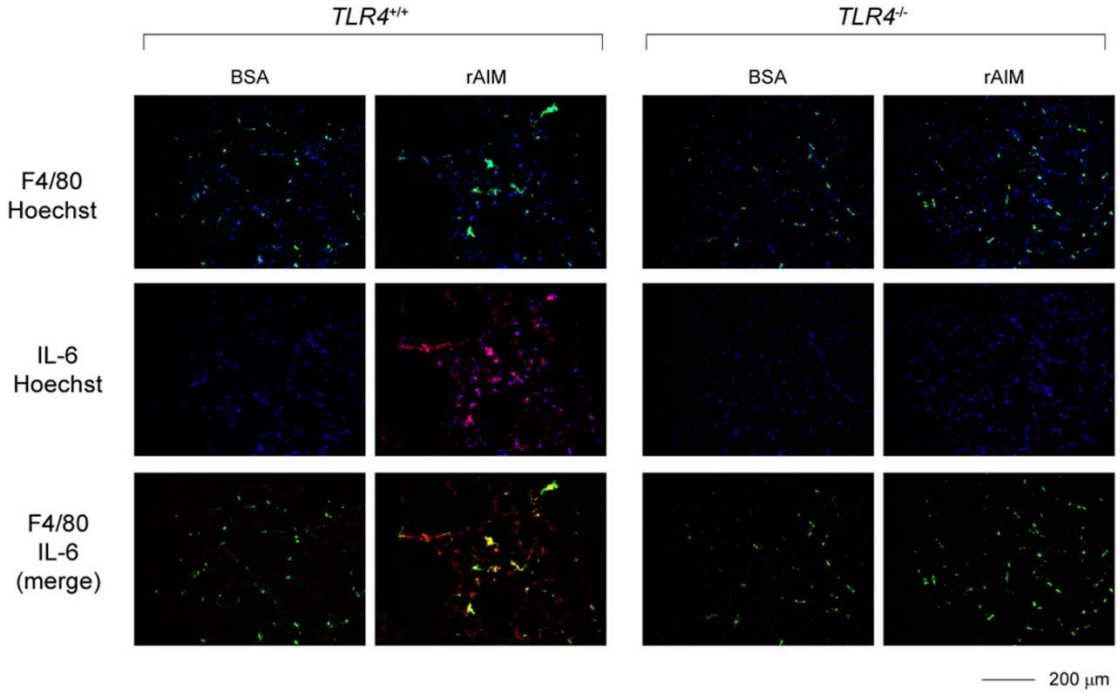


図 43　TLR4$^{-/-}$マウスでは rAIM 投与による脂肪組織への M1 マクロファージ浸潤が抑制される　rAIM 投与群のうち、TLR4$^{+/+}$マウスでのみ脂肪組織への M1 マクロファージ浸潤および蓄積が認められた。TLR4$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、この応答は認められなかった。rAIM 投与条件：300 μg/週 3 回/1 週間（投与期間）

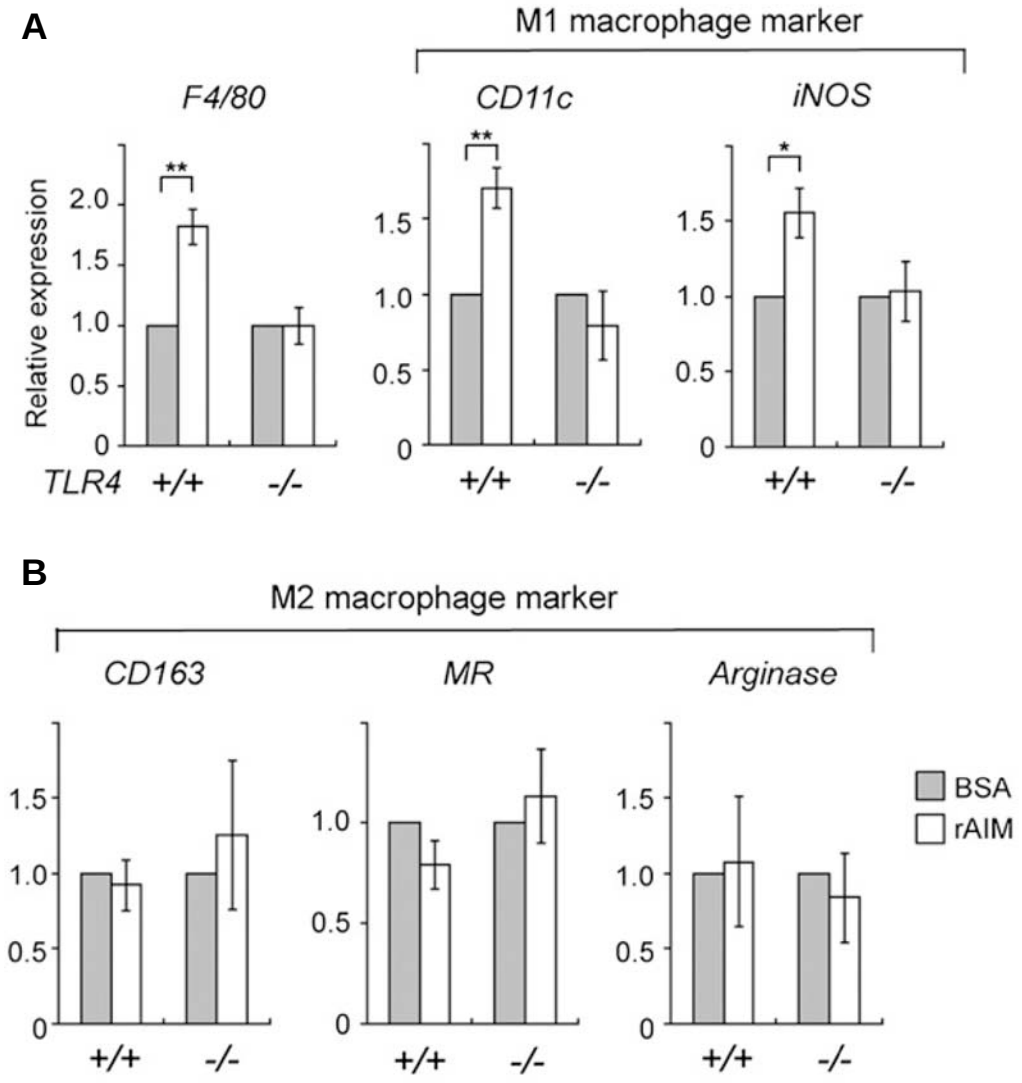


図 44 TLR4$^{+/+}$および TLR4$^{-/-}$マウス脂肪組織におけるマクロファージマーカー遺伝子の発現解析 (A) *f4/80* および M1 マクロファージマーカー遺伝子（*cd11c, iNos*）の発現、(B) M2 マクロファージマーカー遺伝子（*cd163, MR, arginase*）の発現。rAIM 投与群のうち、TLR4$^{+/+}$マウスの脂肪組織でのみ M1 マクロファージマーカー遺伝子の発現亢進が認められた。TLR4$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、この応答は認められなかった。また、M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現に有意な差は認められなかった。n =5、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01、rAIM 投与条件：300 μg/週 3 回/1 週間（投与期間）

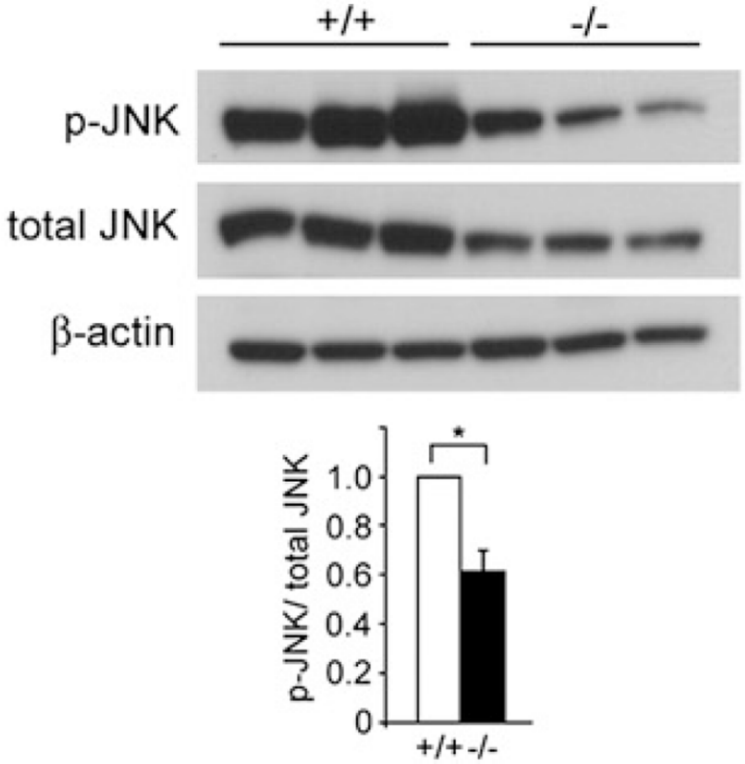


図 45　肥満 AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織では JNK のリン酸化が抑制される

HFD を 12 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、AIM$^{+/+}$マウスと比較して JNK のリン酸化亢進が認められなかった。n =3、平均±SEM、*;P<0.05

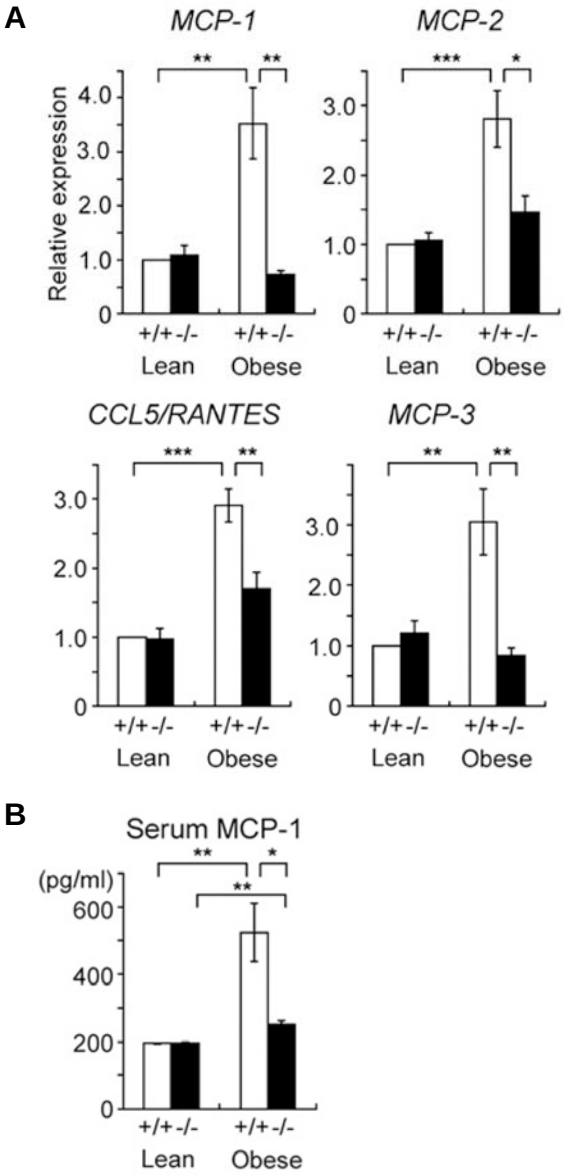


図 46　肥満 AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織ではケモカイン産生が抑制される

(A)脂肪組織におけるケモカイン遺伝子（*mcp-1, mcp-2, mcp-3, ccl5/rantes*）の発現解析、(B)血中 MCP-1 濃度。HFD を 12 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、AIM$^{+/+}$マウスと比較してケモカイン遺伝子の発現亢進が認められなかった。AIM$^{-/-}$マウスでは肥満に伴う血中 MCP-1 濃度の上昇が認められなかった。また、痩せている状態では AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスともにケモカイン産生に有意な差は認められなかった。n =6-8、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001

AIM による Lipolysis の亢進は脂肪細胞だけではなくレジデントマクロファージにおけるケモカイン産生にも影響を与える

Lipolysis により脂肪細胞から放出された飽和脂肪酸が、脂肪細胞だけではなく近接して存在するレジデントマクロファージ（M2 マクロファージ）の TLR4 シグナル伝達経路を活性化し、MCP-1 を含めたケモカインの産生を亢進させる可能性がある。そこで、HFD を 6 週間負荷した $AIM^{+/+}$マウスおよび $AIM^{-/-}$マウスの脂肪組織を免疫組織化学により解析し、M2 マクロファージによる MCP-1 の産生を評価した。その結果、$AIM^{+/+}$マウスのみ MR 染色陽性かつ MCP-1 染色陽性のマクロファージが認められた（**図 47**）。

これらの結果から、AIM による Lipolysis の亢進は脂肪細胞だけではなくレジデントマクロファージにおけるケモカイン産生にも影響を与えることが示唆された。

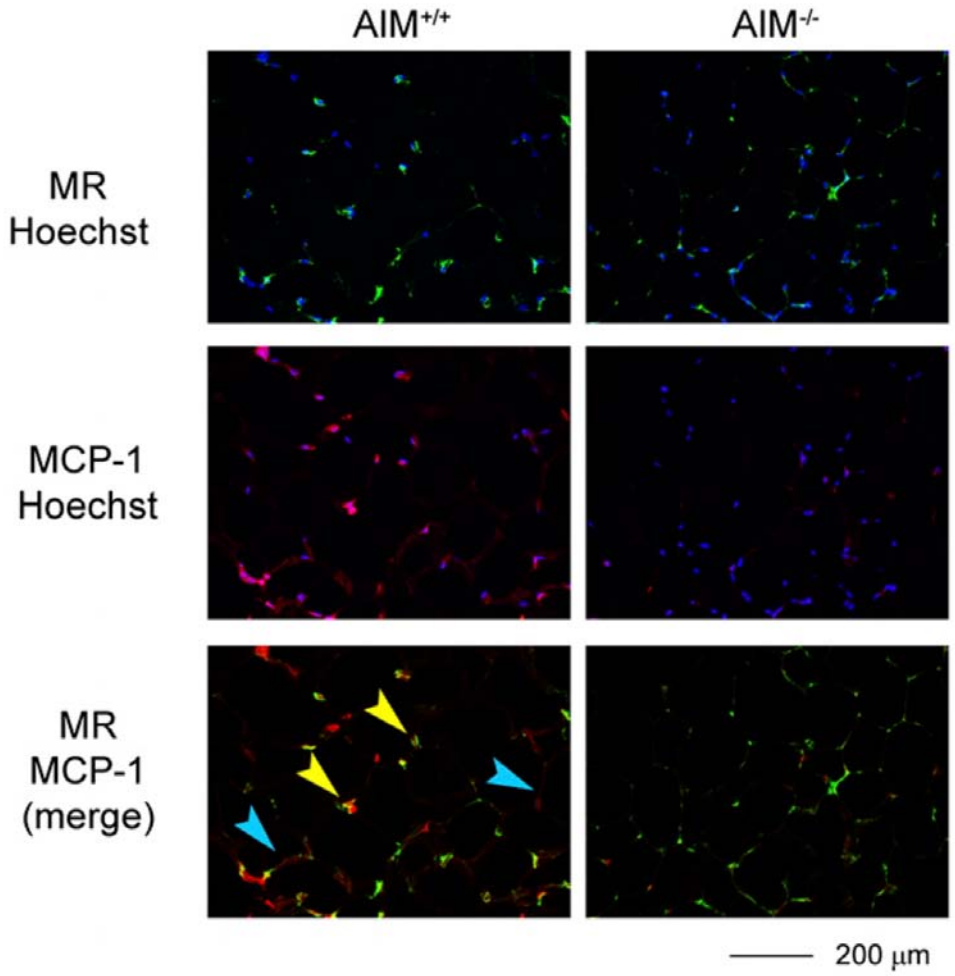


図 47　Lipolysis が M2 マクロファージによるケモカイン産生に与える影響

HFD を 6 週間負荷した AIM$^{+/+}$マウスの脂肪組織において、MCP-1 染色陽性の M2 マクロファージが認められた。これらは、AIM$^{-/-}$マウスでは認められなかった。MR（緑）、MCP-1（赤）、核（青）、青色の矢頭は脂肪細胞、黄色の矢頭は MR 染色陽性 M2 マクロファージを示す。

AIM$^{-/-}$マウスでは肥満に伴う慢性炎症およびインスリン抵抗性が改善され、正常なインスリン感受性を維持する

先に述べたように、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤および蓄積は、脂肪組織おける慢性炎症ならびにインスリン抵抗性の惹起に深く関与する。肥満 AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、マクロファージの浸潤とそれに続く蓄積が抑制されることを明らかにしてきた。ゆえに、肥満 AIM$^{-/-}$マウスでは脂肪組織おける慢性炎症ならびにインスリン抵抗性が改善されている可能性が示唆された。そこで、肥満 AIM$^{-/-}$マウスにおける慢性炎症ならびにインスリン抵抗性の惹起について解析した。

HFD を 12 週間負荷した AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織における炎症性サイトカイン（TNFα, IL-6, IL-1β）の遺伝子発現を定量 PCR により解析した。痩せている状態では、AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウス両群の脂肪組織ににおいて *tnfα*、*IL-6*、*IL-1β*の遺伝子発現に有意な差は認められなかった。HFD を 12 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、AIM$^{+/+}$マウスの脂肪組織と比較して *tnfα*、*IL-6*、*IL-1β*の遺伝子発現が有意に抑制されていた（図48A）。また、AIM$^{-/-}$マウスでは AIM$^{+/+}$マウスと比較して、血中 TNFα濃度および IL-6 濃度が有意に低下していた（図48B）。

さらに、これらのマウスにおけるインスリン感受性を検証するため、インスリ

ンを腹腔内投与し、脂肪組織、筋肉、肝臓におけるAKTならびに GSK3βのリン酸化を解析した。肥満 $AIM^{-/-}$マウスでは $AIM^{+/+}$マウスと比較して、脂肪組織、筋肉、肝臓におけるAKTならびに GSK3βのリン酸化亢進が認められた（**図 49**）。

また、GTT (glucose tolerance test) および ITT (insulin tolerance test) においても、肥満 $AIM^{-/-}$マウスでは $AIM^{+/+}$マウスと比較して良好な応答性が認められた（**図 50**）。

膵β細胞におけるインスリン分泌能を検討するため、HFD を 12 週間負荷した $AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスの膵臓から膵島を単離し、グルコース刺激によるインスリン分泌能を解析した。$AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウス両群において、インスリン分泌能に有意な差は認められなかった（**図 51**）。

すなわち、$AIM^{-/-}$マウスでは肥満に伴う慢性炎症が軽減された結果、インスリン抵抗性の惹起が回避もしくは軽減され、正常なインスリン感受性が維持されていると考えられる。

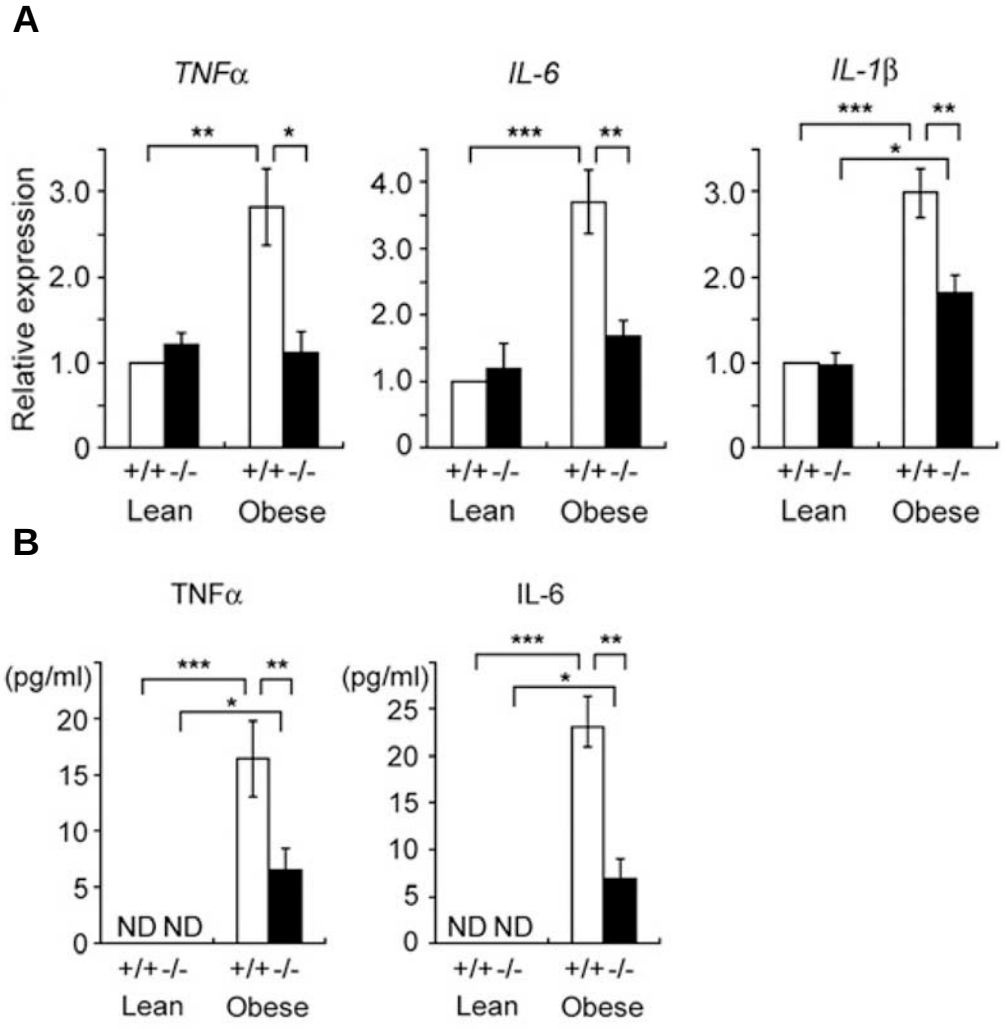


図 48　肥満 AIM$^{-/-}$マウスでは局所および全身性の炎症が抑制される

(A) 脂肪組織における炎症性サイトカイン遺伝子（*tnfα, IL-6, IL1β*）の発現、(B) 血中 TNFαおよび IL-6 濃度。HFD を 12 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスの脂肪組織では、AIM$^{+/+}$マウスと比較して炎症性サイトカイン遺伝子の発現亢進が認められなかった。また、HFD を 12 週間負荷した AIM$^{-/-}$マウスでは、肥満に伴う血中 TNFα および IL-6 濃度の上昇が認められなかった。痩せている状態では AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスともに炎症性サイトカイン産生に有意な差は認められなかった。n =6-8、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001

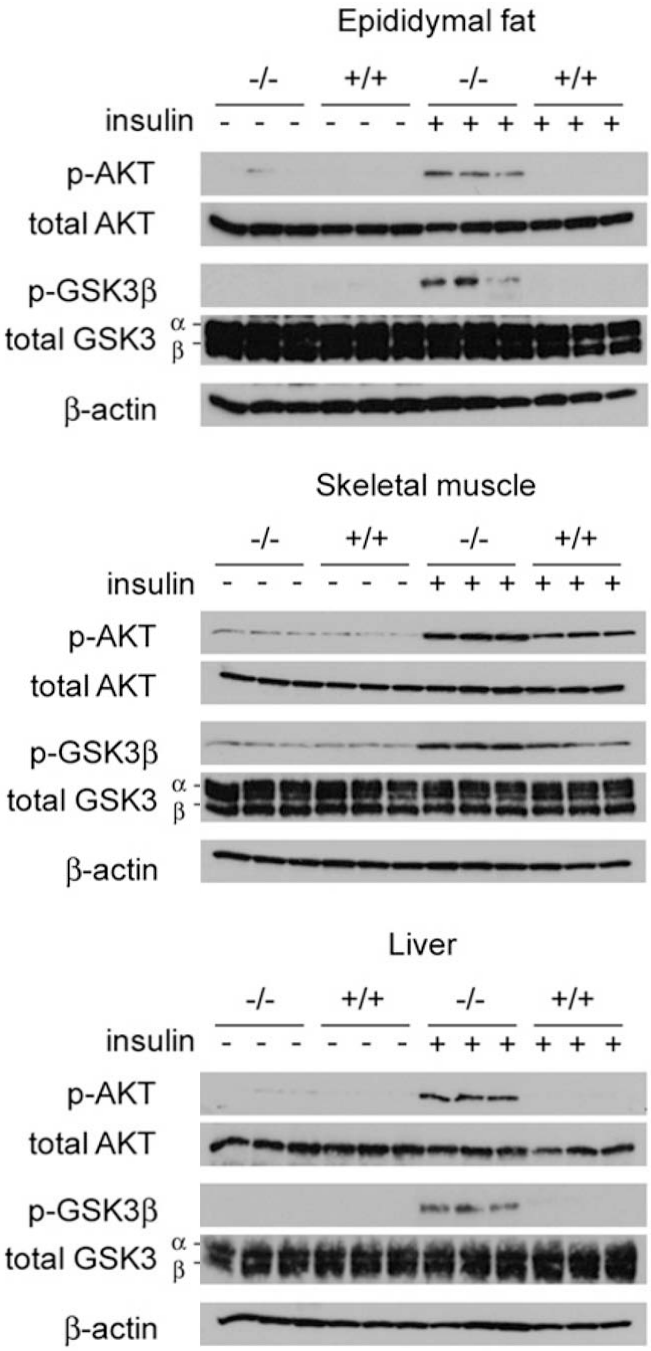


図 49　肥満 AIM$^{-/-}$マウスは正常なインスリン感受性を維持する

HFD を 12 週間負荷した AIM$^{+/+}$マウスの脂肪組織、筋肉、肝臓ではインスリンシグナル伝達経路がほとんど活性化しないが、AIM$^{-/-}$マウスでは、インスリンシグナル伝達経路の正常な活性化が認められた。

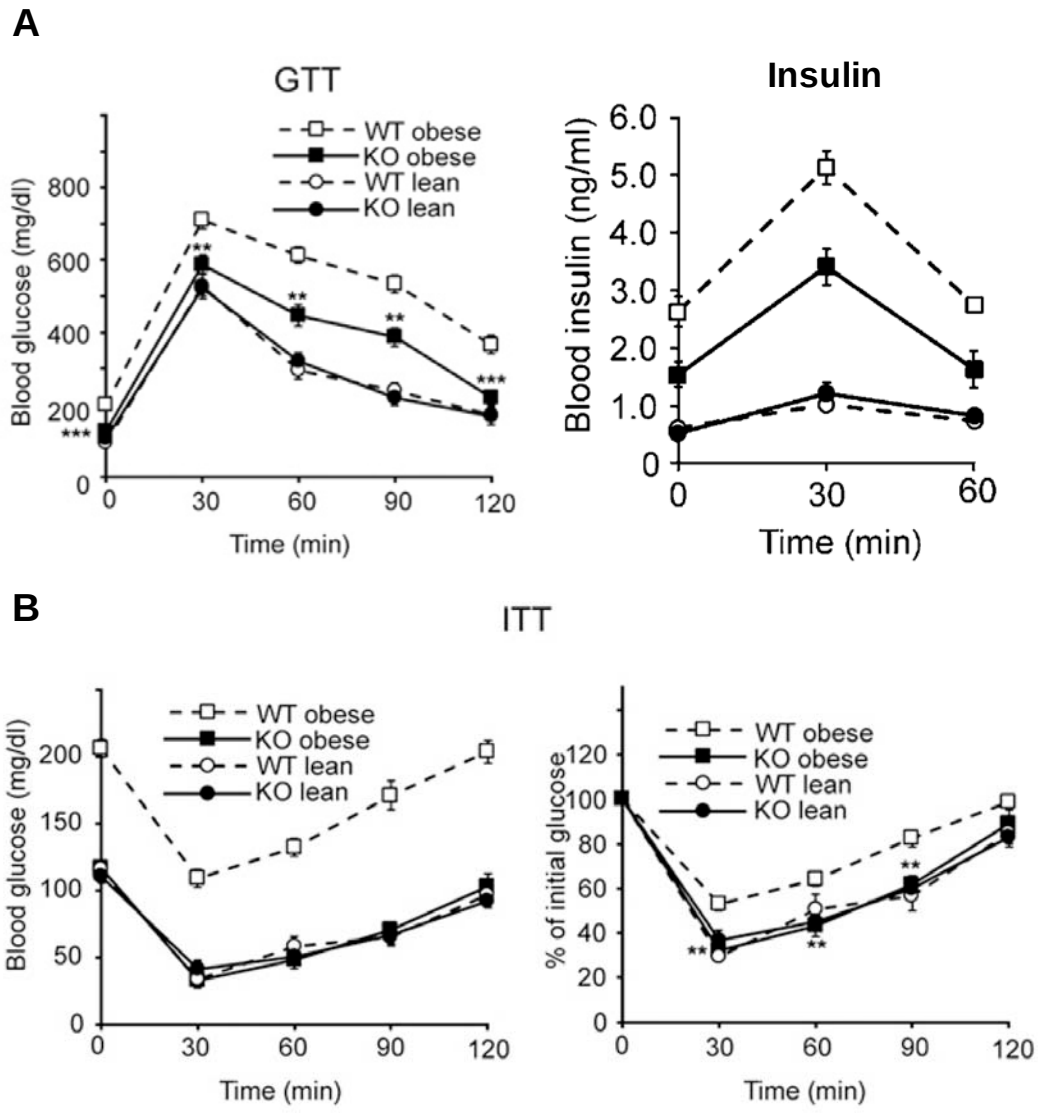


図 50　肥満 AIM$^{-/-}$マウスは耐糖能試験に対して良好な応答性を示す

(A) GTT (Glucose tolerance test) および GTT 実施時の血中インスリン濃度、(B) ITT (Insulin tolerance test)。肥満 AIM$^{-/-}$マウスは耐糖能試験に対して良好な応答性を示した。n =6-8、平均±SEM、*;P<0.05、**;P<0.01, ***;P<0.001

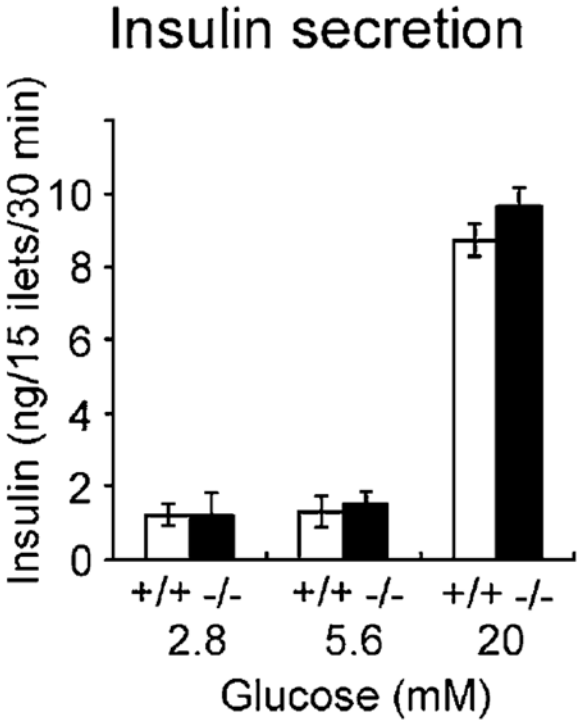


図 51　肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスにおけるインスリン分泌能

肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスから膵島を単離し、グルコース刺激に対するインスリン分泌能を検討した。肥満 AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスともにインスリン分泌能に有意な差は認められなかった。n =6-7、平均±SEM

AIM は肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導する因子であり、メタボリックシンドローム病態形成に深く関与する

これまで、メタボリックシンドロームの病態形成における AIM の役割については不明であった。しかし、本研究から得られた知見は、AIM がメタボリックシンドロームの病態形成に深く関与する可能性を示唆させるものであった。メタボリックシンドロームの病態形成における AIM の役割について以下記す。

肥満の亢進に伴い血中 AIM 濃度が増加することで、脂肪細胞に Lipolysis が誘導される。これにより、脂肪細胞から PA や SA を含む飽和脂肪酸の放出が促進される。放出された飽和脂肪酸は、脂肪細胞自身が発現する TLR4 に作用し、TLR4 シグナル伝達経路を活性化する。TLR4 シグナル伝達経路が活性化された脂肪細胞では MCP-1 を含むケモカインの産生が亢進し、脂肪組織へのマクロファージの浸潤が誘導される。脂肪組織へと浸潤したマクロファージは、さらに AIM や TNFα、IL-6、IL-1βなどの炎症性サイトカインを産生し、マクロファージー脂肪細胞間に炎症増悪サイクルを形成することで慢性炎症を惹起・増悪させ、インスリン抵抗性を引き起こすと考えられる（**図 52**）。すなわち、AIM は肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導する因子のひとつであり、メタボリックシンドロームの病態形成に深く関与している可能性が示唆される。

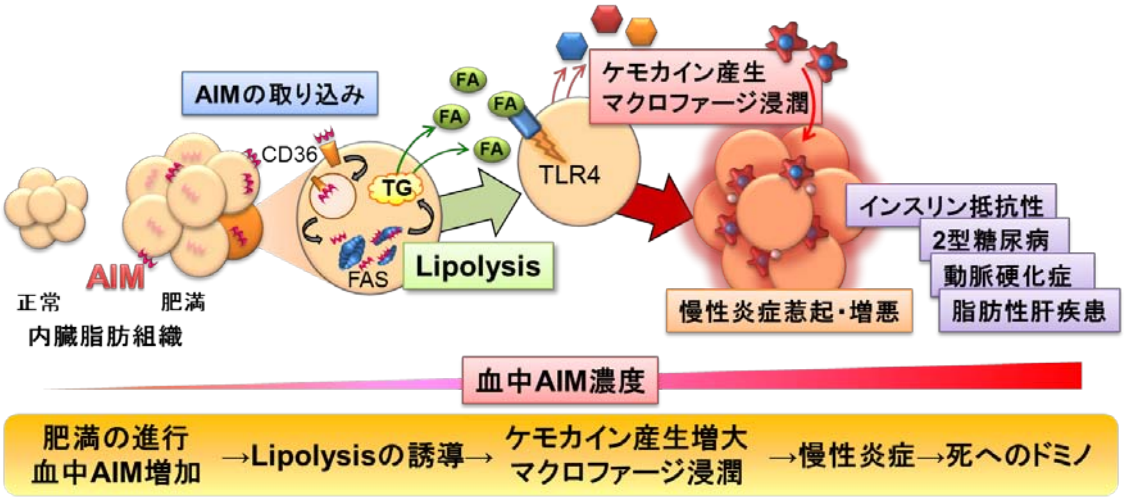


図 52　メタボリックシンドローム病態形成における AIM の役割

肥満の亢進に伴う血中 AIM 濃度の増加により、脂肪細胞において Lipolysis が強力に誘導される。これによりパルミチン酸を主とした炎症性脂肪酸が放出され、脂肪細胞に発現する TLR4 が活性化される。TLR4 を起点とした炎症性シグナルの惹起により、脂肪細胞からのケモカインおよび炎症性サイトカインの産生が増大し、脂肪組織へのマクロファージ浸潤が開始される。浸潤したマクロファージはさらに AIM を産生し、マクロファージ－脂肪細胞間に炎症増悪サイクルを形成することで、慢性炎症を惹起・増悪させ、インスリン抵抗性を引き起こす。これを起点としてメタボリックシンドロームが加速度的に増悪する。TG; triglyceride, FA; fatty acid, TLR4; toll like receptor 4

【考察】

本研究の結果から、AIM は脂肪細胞に直接作用し、FAS の酵素活性を阻害することで Lipolysis を誘導する機能を持つことが強く示唆された。また、肥満に伴う血中 AIM 濃度の増加により脂肪細胞に誘導される Lipolysis が、脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導するトリガーとなりえる可能性を示した。

本研究で得られたこれらの知見をもとに、脂肪細胞に対する AIM の新規機能と生理的意義、AIM の作用機序、メタボリックシンドローム病態形成における AIM の役割ならびに AIM を標的としたメタボリックシンドローム新規治療法の開発について考察する。

脂肪細胞に対する AIM の新規機能と生理的意義

これまで、脂肪組織における AIM の役割については知られていなかった。まず、本研究では、脂肪組織における AIM の発現を検討し、肥満した脂肪組織に浸潤および蓄積したマクロファージが AIM を強く発現していることを見出した（**図 1～図 3**）。この際、非肥満脂肪組織のマクロファージからは AIM の蛍光シグナルが得られなかったこと、肥満脂肪組織において AIM 陽性であったマクロファージは IL6 陽性であったことから、AIM を発現しているマクロファージは

肥満に伴い脂肪組織に浸潤した M1 マクロファージであることが示唆された。また、AIM は脂肪細胞に CD36 を介したエンドサイトーシスにより取り込まれることを明らかとした（**図 4～図 8**）。さらに、脂肪細胞において AIM は FAS を標的とし、構造的あるいは機能的に FAS の酵素活性を阻害することを明らかとした。脂肪細胞に対する AIM の機能は *in vivo* でも同様であった（**図 17～図 21**）。これらの結果から、AIM は FAS インヒビターとしての機能を持つことが強く示唆された。また、AIM は、脂肪細胞の分化抑制ならびに脂肪細胞に対する Lipolysis を誘導することを見出した（**図 9～図 12、図 22**）。脂肪細胞に対する AIM の効果は、FAS 酵素活性の阻害によるものであると示唆されるが、AIM による FAS 酵素活性の阻害は劇的な効果ではなく比較的マイルドな効果である（**図 21**）ことから、AIM の標的分子が FAS 以外にも存在する可能性を完全には否定できず、この点について今後さらに詳細な検討が必要である。

HFD 負荷により $AIM^{-/-}$マウスは $AIM^{+/+}$マウスと比較して脂肪細胞サイズの増大や脂肪重量増加に起因する体重の増加、肥満時における血中グリセロール濃度および血中 FFA 濃度の低下などの表現型を示した（**図 13**）。これらの結果は、3T3-L1 細胞を用いた *in vitro* の実験から得られた結果と類似するものであり、AIM が *in vivo* においても脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する可能性を強く示唆させる。また、$AIM^{-/-}$および $AIM^{+/+}$マウスの食餌量、体温、酸素消費量、自発

運動活性に有意な差は認めらなかった（**図 14**）。これらの結果から、AIM$^{-/-}$マウスにおける脂肪重量の増加は、食餌量の増加やエネルギー消費量の減少によるものではなく AIM 欠損により脂肪細胞の Lipolysis が低下し脂質の蓄積が過剰になったためであると考えられる。さらに、rAIM を投与した AIM$^{-/-}$マウス（rAIM 投与群）では、BSA 投与群と比較して脂肪重量増加の抑制に由来する体重増加量の減少、Lipolysis の誘導（*fsp27*、*perilipin*、*adipophilin* の遺伝子発現抑制）が認められた（**図 15**、**図 16**）。ゆえに、本研究において AIM の新規機能として明らかとした、脂肪細胞に対する FAS 酵素活性阻害を介した Lipolysis 誘導能（**図 25**）は、肥満により増大する脂肪細胞のサイズを縮小させ、脂肪重量を調節する生理的意義を持つものと示唆される。

脂肪細胞に対する AIM の作用機序

本研究の結果から、AIM は CD36 を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞に取り込まれ、FAS インヒビターとして機能することにより Lipolysis を誘導することが示唆される。しかしながら、脂肪細胞における AIM の作用機序については不明な点が残されており、今後の検討が必要である。とりわけ、エンドソームに局在する AIM と細胞質に局在する FAS がどのように相互作用するのか、なぜ AIM による FAS 酵素活性の阻害により Lipolysis が誘導されるのか、この 2

点については脂肪細胞における AIM の作用機序を明らかとするうえで特に重要であると考えられる。以下にこの 2 点についての考察を記す。

① AIM のエンドソーム脱出機構について

脂肪細胞における AIM の細胞内局在を検討した結果、AIM は初期エンドソームに局在し後期エンドソームやリサイクリングエンドソーム、リソソームには局在しなかった（**図 6**）。また、免疫電子顕微鏡像から AIM は細胞質にも局在する可能性が示唆された（**図 7**）。ゆえに、AIM は、初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟過程で細胞質へ局在を変化させ、FAS と相互作用する可能性がある。

多くの植物毒（アブリン、リシンなど）や細菌毒（ジフテリアトキシン、コレラトキシン、滋賀毒素など）は、標的細胞に発現する受容体との結合、エンドサイトーシスによる細胞内への侵入、細胞質への局在変化を経て作用し標的細胞を死に至らしめる［113］。ジフテリアトキシンは、エンドソーム内部の低 pH 環境に応答しエンドソーム膜からの脱出を促すサブユニットを持ち、その機能により細胞質に局在を変化させることが知られている［114］。また、その他の毒素は、小胞体内に蓄積した異常タンパク質を，細胞質に引き出して分解する機構として知られる ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) を利用し細胞質へと局在を変化させる［115-119］。さらに、増殖因子として知られる

FGF-1 (fibroblast growth factor-1) や FGF-2、EGF (epidermal growth factor) もエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、細胞質や核に局在を変化させることが報告されている［120, 121］。FGF-1 や FGF-2 のエンドソームから細胞質への局在変化は、Hsp90 (heat-shock protein 90) 阻害剤により阻害されることが知られており、エンドソーム脱出機構への Hsp90 の関与が示唆されている［120］。一方で、AIM はジフテリアトキシンのような特殊なサブユニットを持たず、小胞体への局在も認められないことから、これらの毒素とは異なる機構で細胞質へと局在を変化させることが示唆される。Hsp90 を介したエンドソーム脱出機構では、特殊なサブユニットや小胞体への局在を必要としない。ゆえに、AIM のエンドソームから細胞質への局在変化に Hsp90 が関与している可能性がある。また、AIM がエンドソーム内部でプロテアーゼによる部分的な分解などを含む何らかのプロセッシングを受けている可能性も否定できない。今後、Hsp90 阻害剤による AIM の細胞内局在変化や細胞分画法とウエスタンブロットによる各細胞内フラクションにおける AIM の分子量変化などを検証し、AIM のエンドソーム脱出機構と局在変化について詳細に検討する必要がある。

② 脂肪細胞における AIM の Lipolysis 誘導機構

in vivo において、FAS は肝臓や脂肪組織などの代謝臓器だけではなく、視床下部にも高発現していることが知られている［122］。FAS 阻害剤である C75 の静

脈内投与では、視床下部の FAS 酵素活性が阻害されることで NP-Y (neuropeptide Y) が減少し、食餌量が著しく低下した結果、体重の減少が認められることが報告されている［98-102］。ゆえに、*in vivo* における FAS 酵素活性阻害による影響は、脂肪細胞の Lipolysis 亢進だけではなく、神経学的影響の重複が懸念される。しかしながら、前述したように $AIM^{+/+}$マウスと $AIM^{-/-}$マウスの食餌量や基礎代謝パラメーターに有意な差はなく（**図 14**）、さらに、視床下部には CD36 の発現が認められないことから、*in vivo* における AIM の効果は神経学的影響によるものではなく脂肪細胞に対する Lipolysis 誘導によるものであると考えられる。

通常、Lipolysis は、アドレナリンやノルアドレナリンなどのホルモン依存的な cAMP/AMPK シグナル伝達経路の活性化を介して HSL や ATGL が活性化されることにより誘導される［108-111］。しかしながら、AIM による Lipolysis の誘導では、cAMP/AMPK シグナル伝達経路の活性化や HSL および ATGL の活性化が認められず（**図 24**）、油滴構成タンパク質関連遺伝子（*fsp27*、*perilipin*、*adipophilin*）の発現減少のみが認められた（**図 11**、**図 12**、**図 16**）。脂肪細胞における FAS 酵素活性の阻害は、脂質の de novo 合成を抑制し［123］、*fsp27*、*perilipin*、*adipophilin* の遺伝子発現減少は効率的な脂質の蓄積を妨げると考えられる。また、脂肪細胞における fsp27、perilipin の遺伝子発現の減少は油滴サイズの減少と Lipolysis の亢進を誘導することが報告されている［126, 127］。ゆえに、AIM による Lipolysis

の誘導は、ホルモン依存的な Lipolysis で認められるようなリパーゼの活性化に伴う脂質の積極的な分解ではなく、脂肪細胞において定常状態にある脂質の合成・蓄積と分解のバランスを脂質の分解側に傾けた結果であると考えられる。今後、AIM による FAS 酵素活性の阻害が、脂質の合成・蓄積と分解のバランスにどのような影響を与えているのか詳細に解析し、脂肪細胞に対する AIM の作用機序を明確に示す必要がある。

メタボリックシンドローム病態形成における AIM の役割

序文で述べたように、メタボリックシンドロームの病態形成に極めて重要なイベントは、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤および蓄積による脂肪組織のリモデリングと慢性炎症の惹起・増悪である。マクロファージと脂肪細胞は、炎症性サイトカインの産生や Lipolysis の誘導を含む複雑な相互作用サイクルを形成し、内分泌器官としての脂肪組織の機能を破綻させ、インスリン抵抗性を引き起こす［10-20］。しかしながら、これは脂肪組織にマクロファージが浸潤し蓄積した後に起こる現象であり、より根本的な原因である肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導する機構については知られていなかった。この点を明らかにすることは、メタボリックシンドロームの病態形成機構について理解を深めるための学術的価値を持つだけではなく、その病態形成

機構に基づいた新しい予防法や治療法の開発を試みるうえでも極めて重要な意味を持つ。

本研究では、新たに同定した AIM の新規機能である脂肪細胞に対する Lipolysis 誘導能がメタボリックシンドロームの病態形成にどのような影響を与えるのか検討した。$AIM^{+/+}$マウスと比較して $AIM^{-/-}$マウスでは、肥満に伴う血中グリセロール濃度および血中 FFA 濃度の上昇が抑制されており、脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤とそれに続く蓄積が著しく減少していることを見出した（**図 26~図 29**）。

AIM はマクロファージを含む様々な細胞のアポトーシスを抑制する機能を持つため、脂肪組織における M1 マクロファージの減少はアポトーシス感受性の亢進によるものである可能性が懸念される［72-77］。しかしながら、肥満 $AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスの脂肪組織における TUNEL 染色陽性細胞数に有意な差は認められなかった（**図 32**）。ゆえに、脂肪組織における M1 マクロファージの減少は、アポトーシスによる細胞死の結果ではなく、脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤が抑制された結果であると考えられる。

また、肥満 $AIM^{-/-}$マウスへの rAIM 投与は脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤とそれに続く蓄積を著しく増加させた（**図 30**）。さらに興味深いことに、肥満 $AIM^{-/-}$マウスへ rAIM を投与した場合に比べ、脂肪組織へ浸潤した M1 マクロ

ファージの絶対数は少ないが、非肥満 AIM$^{-/-}$マウスへ rAIM を投与した場合でも、脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤が増加した（**図 31**）。また、HFD 負荷期間と比例して血中 AIM 濃度の上昇が認められた（**図 26**）。この血中 AIM 濃度の増加は HFD 負荷 3 週間後から 12 週間後まで認められた（**図 26**）。これらの結果から、肥満に伴う血中 AIM の増加が脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤に深く関与している可能性が示唆された。最近、脂肪組織へと浸潤したマクロファージの一部は、IL-1βや IL-18 などの炎症性サイトカイン、NLRP3 インフラマソーム、ミネラルコルチコイドなどの影響を受けて活性化すること［60-64］や CCR2^{+}LY6C^{+}単球として脂肪組織へ浸潤したのち M1 マクロファージへ分化することなどが報告されている［128,129］。本研究の結果だけでは、AIM がマクロファージの分化や活性化に寄与している可能性を否定できず、これらの点に関して、今後さらに詳細な研究が必要であると考えられる。また、肥満に伴う脂肪組織リモデリングでは、マクロファージ以外に T 細胞や B 細胞の浸潤と蓄積が認められ、これらは慢性炎症の惹起や増悪に寄与することが報告されている［69-71］。AIM は T 細胞や B 細胞に対しても作用することが知られている［72, 89］。ゆえに、AIM が脂肪組織への T 細胞や B 細胞の浸潤と蓄積に与える影響についても詳細な解析を行う必要があるだろう。

脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤と蓄積は HFD 負荷 10 週間後から認め

られることが報告されている[70]。上述したように血中 AIM 濃度の上昇は HFD 負荷 3 週後から認められる。したがって、血中 AIM 濃度の上昇が脂肪組織への M1 マクロファージの浸潤と蓄積に先行すると考えられ、血液中の AIM が脂肪組織へと浸潤した M1 マクロファージに由来するものであるとは考え難い。AIM は、肝臓の組織マクロファージであるクッパー細胞に発現していることが知られている［72］。ゆえに、HFD 負荷による血中 AIM 濃度の上昇は、クッパー細胞による AIM の発現亢進に由来する可能性がある。また、AIM は血中において IgM を含むタンパク質と相互作用することが報告されている［73］。そのため、HFD 負荷により AIM と相互作用する因子の濃度が上昇し、AIM の安定性や血中からの排泄に影響を与えた結果、血中 AIM 濃度が上昇する可能性も否定できない。血中 AIM 濃度上昇の機序については、今後、さらに詳細な解析が必要である。

AIM が脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導する機構としては、AIM 自身が走化性物質として機能し脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導する可能性と AIM の作用を受けた脂肪細胞（Lipolysis を誘導された脂肪細胞）が走化性物質を産生・分泌することで脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導する可能性の 2 つが考えられる。まず、AIM や FAS 阻害剤 C75 自体のマクロファージ走化能とこれらを作用させた脂肪細胞の培養上清（Lipolysis を誘導された脂

肪細胞の培養上清）のマクロファージ走化能を比較したところ、Lipolysis を誘導された脂肪細胞の培養上清のみにマクロファージ走化能が認められた（**図 33**）。Lipolysis により脂肪細胞から放出される飽和脂肪酸である PA や SA は TLR2 や TLR4 のリガンドとなりうることが知られており、TLR2 や TLR4 シグナル伝達経路の活性化を経てマクロファージ走化能を持つケモカインの産生を亢進させることが報告されている（**図 38**）［58, 59］。そこで、次に、AIM や C75 自体とこれらにより Lipolysis を誘導された脂肪細胞の培養上清を脂肪細胞に作用させ、TLR シグナル伝達経路の活性化とケモカイン産生について検討した。AIM や C75 自体は、脂肪細胞に対して TLR シグナル伝達経路活性化の指標のひとつとなる IkBa の分解やケモカイン産生の亢進を誘導しなかった（**図 36**）。一方で、AIM や C75 により Lipolysis を誘導された脂肪細胞の培養上清は、脂肪細胞に対して IkBa の分解やケモカイン産生の亢進を誘導し、これらは TIRAP 阻害剤により抑制された（**図 34、図 35**）。さらに、TLR2 および TLR4 経路のどちらが脂肪細胞におけるケモカイン産生に影響を与えるかどうかを判断するため、siRNA により TLR4 をノックダウンした脂肪細胞や $TLR4^{-/-}$マウスを用いて、AIM による Lipolysis に伴う脂肪細胞のケモカイン産生能を解析した。その結果、TLR4 をノックダウンした脂肪細胞や $TLR4^{-/-}$マウスでは、AIM による Lipolysis に依存した脂肪細胞におけるケモカイン産生および脂肪組織へのマクロファージの浸潤が

抑制されていた（**図 39～図 44**）。これらの結果から、AIM 自身が走化性物質として機能し脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導するのではなく、AIM により Lipolysis を誘導された脂肪細胞から放出された飽和脂肪酸が脂肪細胞自身に作用し TLR4 シグナル伝達経路の活性化を介してケモカインの産生を亢進させることにより脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導することが示唆された。実際、TLR4$^{-/-}$マウスでは、AIM$^{-/-}$マウスと同様に、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤が抑制されることが報告されており［58, 59, 65 - 68］、AIM による脂肪組織へのマクロファージの浸潤を誘導するメカニズムが TLR4 を介したものであることを支持するものと考えられる。

また、本研究では、AIM 欠損が慢性炎症やインスリン抵抗性に惹起に与える影響について検討した。AIM$^{-/-}$マウスでは AIM$^{+/+}$マウスよりも肥満し易いにも関わらず、脂肪組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現が抑制されており、血中 TNFa や IL-6 濃度の上昇も認められなかった（**図 48**）。さらに、脂肪組織、筋肉、肝臓における正常なインスリン応答性と耐糖能の維持が認められた（**図 49~図 51**）。これらの結果から、AIM の欠損により、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤が抑制され、その結果として慢性炎症の惹起や増悪が軽減されることで正常なインスリン感受性が維持されるものと考えられる。

本研究から得られた知見から、AIM はメタボリックシンドロームの病態形成に

次のように寄与していると考えられる。まず、肥満に伴い脂肪細胞の肥大化と血中 AIM 濃度の上昇が引き起こされる。血中濃度の上昇に伴い AIM は脂肪組織において、CD36 を介して脂肪細胞に取り込まれ FAS 酵素活性を阻害することにより Lipolysis を誘導する。Lipolysis を誘導された脂肪細胞から放出された PA や SA などの飽和脂肪酸は、脂肪細胞自身発現する TLR4 を活性化させケモカインの産生と分泌を促進させる。これにより脂肪組織へのマクロファージの浸潤が誘導され、脂肪組織リモデリングが開始あるいは加速される。脂肪組織に浸潤したマクロファージは AIM を発現し脂肪組織局所的な AIM 濃度を上昇させ脂肪細胞の Lipolysis をさらに誘導することにより、脂肪組織へのマクロファージの浸潤を加速させると考えられる。脂肪組織に浸潤し蓄積したマクロファージは炎症性サイトカインを産生し慢性炎症を惹起および増悪させ、インスリン抵抗性を引き起こし、2 型糖尿病をはじめとした様々な疾患を発症させる。すなわち、AIM はメタボリックシンドロームの病態形成に極めて重要なイベントである脂肪組織へのマクロファージの浸潤を開始および増悪させる分子のひとつであると考えられ、メタボリックシンドロームの病態形成に重要な役割を担う分子であることが示唆される。

AIM による脂肪細胞の Lipolysis の誘導を介したメタボリックシンドロームの病態形成には、CD36、FAS、TLR4 などが重要な役割を果たす。したがって、

AIM$^{-/-}$マウスの表現型として認められた脂肪組織へのマクロファージの浸潤の抑制、慢性炎症の軽減とインスリン感受性の維持が CD36$^{-/-}$、TLR4$^{-/-}$マウスにおいても認められ、FAS$^{-/-}$マウスではその逆の表現型が認められるはずである。実際に、TLR4$^{-/-}$マウスでは、HFD 負荷による脂肪組織へのマクロファージの浸潤や慢性炎症およびインスリン抵抗性の惹起が軽減されることが報告されている［58, 59, 65 – 68］。また、CD36$^{-/-}$マウスにおいても、高コレステロール食負荷による動脈硬化症の抑制［130］や HFD 負荷による脂肪組織へのマクロファージ浸潤の抑制、慢性炎症、インスリン抵抗性の軽減など AIM$^{-/-}$マウスと同様の表現型を示すことが報告されている［131］。一方、ヒトでは全ての細胞の CD36 が欠損しているⅠ型 CD36 欠損症と血小板の CD36 のみが欠損しているⅡ型 CD36 欠損症の 2 種類の CD36 欠損症例が報告されている［132 - 134］。Ⅱ型 CD36 欠損症患者における糖脂質代謝ならびに耐糖能についての検討例は報告されていないが、Ⅰ型 CD36 欠損症患者における糖脂質代謝ならびに耐糖能についての検討結果から、CD36 欠損症患者は脂質トランスポーターとしての CD36 の機能を欠損しているため血中の脂質が高値を示しインスリン抵抗性を呈すると報告されている［135］。しかし、これとは逆に CD36 欠損症はインスリン抵抗性の惹起とは無関係であるとの報告もあり［136］、議論が分かれている。今後、AIM$^{-/-}$や CD36$^{-/-}$マウスで確認された表現型がヒトの CD36 欠損症患者においても確認で

きるのか詳細な検討が待たれる。FAS$^{-/-}$マウスは胚生致死の表現型を示し解析不能であるが［97］、視床下部における FAS コンディショナルノックアウトマウスや FAS 阻害剤を用いた解析から、脂肪重量の調節における FAS の重要性が報告されている［98-107］。しかしながら、脂肪組織へのマクロファージの浸潤、慢性炎症やインスリン抵抗性の惹起における FAS の関与については詳細な検討が行われておらず、今後、脂肪細胞特異的な FAS 欠損や過剰発現マウスを作製し、脂肪組織へのマクロファージの浸潤、慢性炎症やインスリン抵抗性の惹起における FAS の関与と AIM による FAS 酵素活性の制御の重要性について検討する必要がある。

FAS、CD36、TLR4 は脂肪重量の調節やメタボリックシンドロームの病態形成に重要な役割を持つ分子であると考えられ、これらの欠損マウスは AIM$^{-/-}$マウスで見られる一部の表現型と類似した表現型を示すことから、前述したように AIM はメタボリックシンドローム病態形成機序において重要な役割を担う分子のひとつであると考えられる。

AIM を標的としたメタボリックシンドローム新規治療法の開発について

AIM はメタボリックシンドロームの病態形成において、肥満と慢性炎症ならびにインスリン抵抗性をつなぐ極めて重要な役割を持つ。ゆえに、AIM はメタボリックシンドロームの治療標的となりえる可能性がある。

AIM を標的とした治療法を開発するためには、まず、人において血中 AIM 濃度とメタボリックシンドロームの相関関係を明らかにする必要がある。そのためには、血中 AIM 濃度を正確に測定することが可能な ELISA 測定系の開発と大規模なコホート研究を展開する必要があると考えられる。

次に、AIM の機能を阻害する方法を開発する必要がある。AIM の機能阻害もしくはそれと同等の効果を得る方法としては、AIM 自体を阻害する方法、AIM のエンドサイトーシスを仲介する CD36 を阻害する方法、FAS の酵素活性を阻害する方法の 3 つが考えられる。しかしながら、多機能タンパク質である CD36 や視床下部での発現が認められている FAS の機能阻害は予期せぬ副作用を招く可能性が高い。ゆえに、AIM 自身を標的とした、低分子化合物や中和抗体による AIM 阻害剤の開発が必要であると考えられる。

将来的に、これらの開発が成功した場合、メタボリックシンドロームの病態形成機序において重要な役割を担うと考えられる AIM を標的とした新しい治療法となる可能性が期待される。

【結語】

本研究では、メタボリックシンドローム病態形成における AIM の役割の解明を目指して研究を展開した。その結果、AIM は、脂肪細胞に対して Lipolysis を誘導する機能を持つこと、この機能がメタボリックシンドロームの病態形成に極めて重要なイベントである、脂肪組織へのマクロファージ浸潤を誘導するメカニズムの一端を担っていることを明らかとした。本研究から得られた知見は、AIM を標的としたメタボリックシンドロームの新しい予防法や治療法の開発につながると考えられる。

今後、本研究の成果が、より詳細なメタボリックシンドローム病態形成機構の解明や病態形成機構に基づく新規予防法ならびに治療法開発の一助となることを切に願う。

【材料と方法】

試薬および抗体

試薬類は特に言及しない限り Wako 社もしくは Sigma 社から購入したものを使用した。合成オリゴヌクレオチドについては、Invitrogen 社へ合成を依頼し購入した。免疫染色および各生化学実験に使用した抗体は次のとおりである。

一次抗体：

抗 F4/80 抗体（clone: RM2900, Calotag）

抗 IL6 抗体（clone: MP520F3, R&D Systems）

抗 PPARγ2 抗体（rabbit polyclonal antibody, Abcam）

抗 EEA1 抗体（clone: C45B10, Cell Signaling Technology）

抗 Rab7 抗体（clone: D95F2, Cell Signaling Technology）

抗 Rab11 抗体（rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Technology）

抗 total PKA C-α抗体（rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Technology）

抗 phosphorylated at Thr197 PKA C-α抗体（rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Technology）

抗 total AMPKα抗体（rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Technology）

抗 phosphorylated at Thr172 AMPKα抗体（rabbit polyclonal antibody, Cell

Signaling Technology）

抗 AIM 抗体（SA-1 rabbit polyclonal antibody, 当研究室にて作製［82］）

抗 Mannose Receptor（MR）抗体（clone: MR5D3, BioLegend）

抗 IκBα抗体（rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Technology）

抗 total JNK 抗体（clone: G151-666, BD Bioscience）

抗 phosphorylated JNK 抗体（rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Technology）

抗 total AKT 抗体（clone: 11E7, Cell Signaling Technology）

抗 phosphorylated AKT 抗体（clone: 244F9, Cell Signaling Technology）

抗 total GSK3β抗体（rabbit polyclonal antibody, Acris）

抗 phosphorylated GSK3β抗体（rabbit polyclonal antibody, Abcam）

抗 MCP1 抗体（rabbit polyclonal antibody, Abcam）

抗 HA 抗体（clone: 3F10, Roche）

抗β–Actin 抗体（clone: ACTN(C4), Abcam）

抗 FAS 抗体（rabbit polyclonal antibody, Santacruz）

二次抗体：

抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 488 （goat polyclonal antibody, Invitrogen）

抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 594 （goat polyclonal antibody, Invitrogen）

抗 mouse IgG 抗体 Alexa Fluor 488 （chicken polyclonal antibody, Invitrogen）

抗 mouse IgG 抗体 Alexa Fluor 594 （goat polyclonal antibody, Invitrogen）

抗 rat IgG 抗体 Alexa Fluor 488 （donkey polyclonal antibody, Invitrogen）

抗 rat IgG 抗体 Alexa Fluor 594 （chicken polyclonal antibody, Invitrogen）

抗 rabbit IgG 抗体 HRP conjugated （goat polyclonal antibody, PIERCE）

抗 rabbit IgG 抗体 covalently linked with 1 nm gold particle （goat polyclonal antibody, Nanoprobes）

抗 mouse IgG 抗体 HRP conjugated （goat polyclonal antibody, PIERCE）

抗 HA 抗体 HRP conjugated （clone: 3F10, Roche）

抗 FLAG 抗体 HRP conjugated （clone: M2, Sigma）

中和抗体：

抗 mouse-CD36 抗体（clone: JC63.1, Abcam）

Control Immunoglobrine：

Mouse IgA（BETHYL）

Mouse IgG（Sigma）

Rabbit IgG（Sigma）

Rat IgG（Sigma）

動物

AIM$^{-/-}$マウスの作製は既報のとおりであり、AIM$^{-/-}$マウスは C57BL/6J と 13 世代以上戻し交配したものを使用した［72］。また、本研究では、AIM$^{+/-}$マウス同士を交配させ得られた AIM$^{-/-}$マウスおよび AIM$^{+/+}$マウスを 8 ~ 10 週齢まで飼育したのち各実験に用いた。全ての動物は、東京大学動物施設にて特定病原体不在（Specific Pathogen Free; SPF）環境下、12 時間の明暗周期、自由食餌下で飼育した。通常飼育においては、CE-2（日本クレア）を飼料として用いた。高脂肪食負荷時には、糖尿病・肥満研究用飼料 High Fat Diet 32（HFD32, 日本クレア）を飼料として用いた。CD36$^{-/-}$マウス［95］の組織は、Lerner Research Institute の Maria Febbraio 博士より供与して頂いたものを実験に使用した。TLR4$^{-/-}$マウスは、東京大学医科学研究所感染遺伝学分野の三宅健介教授より供与して頂いた。本研究における動物実験は、東京大学医学系研究科動物実験審査委員会の承認を受け、同委員会の定める動物実験規定を遵守して行われた。

細胞培養

HEK293T 細胞、3T3-L1 細胞は、10 % FBS (Invitrogen)、0.2 % Gentamicin reagent solution (Invitrogen)を含む DMEM+GlutaMAX-I (Invitrogen)培地（本研究ではこの培地を維持培地と定義する）を用いて、37℃、5 % CO2 の条件下で培養した。

各細胞は 90%コンフルエントの状態まで培養後、0.25 % Trypsin‐EDTA (Invitrogen) 処理により細胞培養ディッシュから剥離し、1:10 の割合で継代した。3T3-L1 細胞については、継代回数が成熟脂肪細胞への分化率に影響を及ぼす可能性があることから、継代回数 10 回までの細胞を実験に使用した。

PCR

サーマルサイクラーは Gen Amp PCR System9700（Applied Biosystem）を用いた。DNA ポリメラーゼは、必要に応じて rTaq polymerase（TaKaRa）および KOD plus（TOYOBO）を用いた。反応溶液の調製は、各 DNA ポリメラーゼに付属のプリトコールに従った。アニーリング温度は、GC%法で計算された各プライマーの Tm に従い、時間は全て 30 秒で行った。また、エクステンション温度は、Ex-Taq polymerase（TaKaRa）では 72 ℃、KOD plus（TOYOBO）では 68 ℃で行い、時間は各 DNA ポリメラーゼの 1 分間当たりの増幅能を考慮して行った。

アガロースゲルからの DNA の回収

GENE CLEAN II kit （フナコシ）を用いた。実験操作は付属のプロトコールに従った。

制限酵素処理

実験に使用した制限酵素は、全て TaKaRa 社から購入し、実験操作は付属のプロトコールに従った。制限酵素は、DNA 1 μg あたり 1 U を使用した。

ライゲーション

ライゲーションには、Rapid DNA Ligation Kit（Roche）を使用し、実験操作は付属のプロトコールに従った。

発現ベクターの構築

mouse AIM-HA 発現ベクター（pCAGGS-AIM-HA）の構築については既報のとおりである［72］。mouse Fatty Acid Synthase （FAS）の ORF 配列をクローニングするため、財団法人かずさ DNA 研究所の小原收博士より供与して頂いた FAS の部分的 cDNA 配列を含むクローンから PCR により FAS の cDNA フラグメントを増幅した。得られた複数の cDNA フラグメントを pBluescript（Promega）に導入し、FAS の全 ORF 配列（ヌクレオチド：+1 ~ 7515）を再構成した。得られた FAS の全 ORF 配列を pFLAG-CMV2（Sigma）に導入し、FLAG-FAS 融合タンパク質発現ベクターpFLAG-FAS を構築した。また、得られた FAS の全 ORF 配列から、KS（ヌクレオチド： 4 ~ 1230）、MAT（ヌクレオチド：1261 ~ 2460）、DH

（ヌクレオチド：2473 ~ 2907）、CC（ヌクレオチド：2908 ~ 4887）、ER（ヌクレオチド：4888 ~ 5568）、KR（ヌクレオチド：5596 ~ 6318）、ACP（ヌクレオチド：6331 ~ 6583）、TE（ヌクレオチド：6589 ~ 7515）フラグメントを PCR により取得し、pFLAG-CMV2 に導入することで FAS の機能的ドメイン発現ベクターを構築した。

大腸菌の transformation（ヒートショック法）

E.coli DH5αをコンピテントセルとして用いた。コンピテントセル 100 μl に対して 10 μl のライゲーション溶液を混合し、氷上に 10 分間置き、42 ℃、50 秒加熱後、5 分間氷上で冷却した。これを 50 μg / ml アンピシリン含有 LB プレートにスプレッドし、37 ℃で 16 時間程度培養した。

大腸菌からのプラスミド DNA の回収

小スケール（1～2 ml）の場合には、GENE CLEAN II kit （フナコシ）を使用した。中スケール（50～100 ml）の場合には、QIAfilter Plasmid Midi Kit （QIAGEN）を使用した。実験操作は付属のプロトコールに従った。

細胞の Transfection

HEK293T 細胞への transfection は、X-treme GENE 9 DNA Transfection Reagent（Roche）を用いて行った。実験操作は付属のプロトコールに従った。

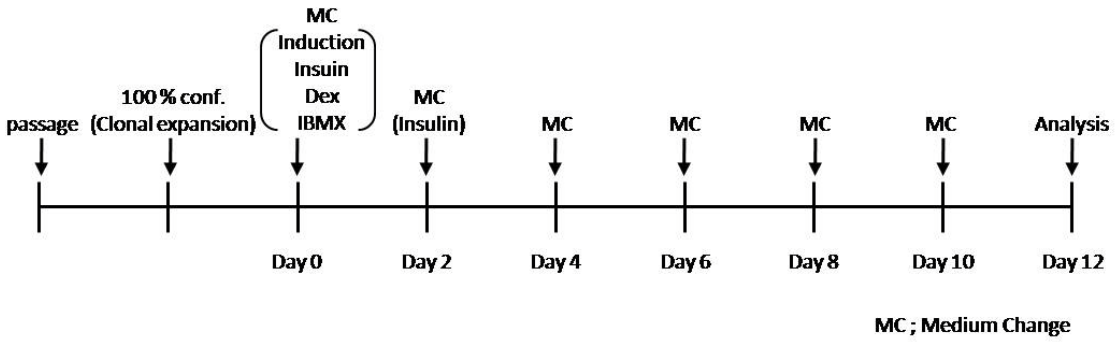
recombinant mouse AIM-HA（rAIM）の作製

pCAGGS-AIM-HA を transfection した HEK293T 細胞は、0.1 % FBS および 0.2 % gentamicin を含む FreeStyle 293 medium（Invitrogen）で 3 日間培養した。上清を 4000 rpm、15 分間、4 ℃の条件で遠心分離し、さらに、PES Filter Unit 0.45 mm pore size（Thermo scientific）を用いて濾過することで細胞残屑を完全に取り除いた。HA 抗体カラムは、gel bed volume 6 ml となるように Anti-HA Affinity Matrix（Roche）をカラムに充填して作製した。Equilibration buffer（20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5）をカラムにロードし平衡化させた。細胞残屑を除去した培養上清を平衡化したカラムにロードし、rAIM を Anti-HA Affinity Matrix に結合させた。Gel bed volume の 20 倍量の wash buffer（20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.05 % Tween20, PH 7.5）を用いて洗浄後、界面活性剤を除去する目的で Gel bed volume の 10 倍量の Equilibration buffer をロードし洗浄した。rAIM の溶出は 13 ml の Elution buffer（0.1 M Glycine, pH 2.0）を用いて行った。rAIM を含む溶出液は、Neutralization buffer（1 M Tris-HCl, pH 8.5）を用いて

直ちに中和した。中和後の溶出液は、VIVASPIN 20（Sartorius stedim biotech）を用いて PBS に置換し、OD280 = 1.0 まで濃縮したのち、実験に用いた。

3T3-L1 細胞の分化誘導

実験目的に適したサイズの細胞培養ディッシュに 3T3-L1 細胞を 70 %コンフルエント程度になるよう播種した。培地交換を 2 日間ごとに行い、100 %コンフルエントまで培養した後、さらに 2 日間培養し clonal expansion による細胞形態の変化および細胞密度の増加を確認した。DMEM（10 % FBS, 0.2 % Gentamicin 含有）培地に insulin（Sigma）を 1 μg/ml、dexamethasone （DEX, Sigma）を 1 μM、3-isobutyl-1-methylxanthine（IBMX, Sigma）を 500μM の濃度になるように添加し、誘導培地を作製した。維持培地を誘導培地に交換し、成熟脂肪細胞への分化誘導を開始した。なお、分化誘導開始時を Day 0 と定義した。分化誘導開始から 2 日後（Day 2）、誘導培地を 1 μg/ml insulin を含む維持培地に交換し、さらに 2 日間培養した。分化誘導開始から 4 日後（Day 4）、1 μg/ml insulin を含む維持培地から通常の維持培地に交換し、以後は 2 日間おきに培地交換を行い、Day 12 を最長培養期間として培養を継続した。また、分化誘導のスケジュールを次図に示した。



3T3-L1 細胞内への AIM 取り込み実験

Poly-L-lysisne 0.01 % solution M.W.150,000 ~ 300,000（Sigma）を用いてコートした Lab-Tek II 4-well Chamber Slide（Nalge Nunc International）に 1×10^4 個の 3T3-L1 細胞を撒き、成熟脂肪細胞へ分化させた。分化誘導 6 日目に 5 μg/ml の rAIM を添加し、3 時間、37℃の条件で培養した。培養後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、目的に応じた抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡（LSM510, Carl Zeiss Co Ltd）による観察を行った。

免疫蛍光染色

研究目的に適した実験操作を行い、PBS により洗浄した細胞に対して、氷冷した 4 % Palaformaldehyde (PFA) / PBS を用いて、氷上、20 分間の条件で固定した。4 % PFA / PBS を除去し、TBS にて 2 回洗浄後、0.2 % Triton X-100 / TBS を用いて、室温、5 分間の条件で permeabilization 処理を行った。TBS にて 2 回洗浄し、

5 % BSA / TBST (TBS + 0.1 % Tween-20)を用いて、室温、1 時間の条件で blocking 処理を行った。5 % BSA / TBST を用いて一次抗体を希釈し、4 ℃、overnight の条件で一次抗体反応を行った。本研究で免疫蛍光染色に用いた一次抗体の種類と希釈率は次の通りである（カッコ内は抗体希釈率を表す）: 抗 AIM 抗体（1:300）、抗 HA 抗体（1:200）、抗 PPARγ2 抗体（1:100）、抗 EEA1 抗体（1:100）、抗 Rab7 抗体（1:100）、抗 Rab11 抗体（1:100）。一次抗体反応終了後、TBST にて 2 回洗浄し、5 % BSA / TBST を用いて二次抗体を希釈し、室温、遮光、1 時間の条件で二次抗体反応を行った。本研究で免疫蛍光染色に用いた二次抗体の種類と希釈率は次の通りである：抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 488（1:500）、抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 594（1:1000）、抗 rat IgG 抗体 Alexa Fluor 488（1:500）、抗 rat IgG 抗体 Alexa Fluor 594（1:1000）。二次抗体反応終了後、TBST にて 3 回洗浄した。洗浄後、1 μg/ml の Hoechst 33258（Sigma）を用いて、室温、5 分間の条件で核染色を行った。核染色終了後、TBST にて 2 回、TBS で 1 回洗浄し、退色防止剤含有水系封入剤 ProlongGold（Invitorgen）を用いて封入した。封入後、共焦点顕微鏡（LSM510, Carl Zeiss Co Ltd）による観察を行った。なお、核以外のオルガネラ染色を実施した際の染色試薬は次のとおりであり、実験操作は付属のプロトコールに従った：リソソーム（LysoTracker Red DND-99, Invitrogen）、脂肪滴（Nile Red, Sigma）

抗 CD36 中和抗体による AIM 取り込み阻害実験

Poly-L-lysisne コートした Lab-Tek II 4-well Chamber Slide（Nalge Nunc International）に 1×10^4 個の 3T3-L1 細胞を撒き、成熟脂肪細胞へ分化させた。分化誘導 5 日目から 10 μg/ml の抗 CD36 中和抗体を作用させ、分化誘導 6 日目に 5 μg/ml の rAIM を添加し、3 時間、37℃の条件で培養した。培養終了後、抗 HA 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡観察により抗 CD36 中和抗体による AIM 取り込み阻害効果を評価した。

免疫電子顕微鏡

Poly-L-lysisne コートした 24 mm × 24 mm カバーガラス（マツナミ）を設置した 6-well plate（BD Falcon）に 5×10^5 個の 3T3-L1 細胞を撒き、成熟脂肪細胞へ分化させた。分化誘導 6 日目に 5 μg/ml の rAIM を添加し、3 時間、37℃の条件で培養した。培養後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、氷冷した 4 % PFA / PBS を用いて、氷上、20 分間の条件で固定した。4 % PFA / PBS を除去し、TBS にて 2 回洗浄後、0.2 % Triton X-100 / TBS を用いて、室温、5 分間の条件で permeabilization 処理を行った。TBS にて 2 回洗浄し、5 % normal goat serum / TBST を用いて、室温、30 分間の条件で blocking 処理を行った。5 % normal goat serum / TBST を用いて抗 AIM 抗体（1:600）を希釈し、4 ℃、overnight の条件で一次抗体反応を行

った。一次抗体反応終了後、TBST にて 2 回洗浄し、5 % normal goat serum / TBST を用いて抗 rabbit IgG 抗体 covalently linked with 1 nm gold particle（1:200）を希釈し、室温、1 時間の条件で二次抗体反応を行った。二次抗体反応終了後、TBST にて洗浄し、HQ silver（Nanoprobes）を用いて銀増感処理を行った。実験操作は付属のプロトコールに従った。試料を Epon 樹脂（Nisshin EM）に包埋し、薄切切片を作製した後、電子顕微鏡（H-7100, 日立）による観察を行った。

rAIM による 3T3-L1 分化抑制実験

12-well plate（BD Falcon）に 2.5×10^5 個の 3T3-L1 細胞を撒き、分化誘導可能な細胞密度まで培養した。5 μg/ml の rAIM を含む分化誘導試薬を添加して上述の方法に従って 12 日間培養した。コントロールとして 5 μg/ml の BSA を含む分化誘導試薬を用いた。FAS inhibitor C75（フナコシ）は 25 μM の濃度で用いた。rAIM による 3T3-L1 分化抑制効果は Oil red O 染色、リアルタイム PCR による成熟脂肪細胞マーカー遺伝子の発現量解析により評価した。

Oil red O 染色

2-propanol 中に 0.5 (w/v) %の濃度で Oil red O（Sigma）を溶解し、Oil red O 染色液を作製した。染色時には、Oil red O 染色液を MilliQ 水で希釈し（Oil red O 染

色液 : MilliQ 水 = 6 : 4)、ひだ折り濾紙を用いて濾過し使用した。分化誘導した 3T3-L1 細胞を PBS で洗浄し、4% PFA / PBS で室温、20 分間の条件で固定した。固定後の細胞を MilliQ 水で洗浄し、60 % 2-propanol で室温、1 分間、処理した。60 % 2-propanol を除去し、希釈した Oil red O 染色液を用いて、室温、1 時間の条件で染色した。染色終了後、60 % 2-propanol にて 1 回、MilliQ 水にて 5 回洗浄し、検鏡した。

rAIM による Lipolysis 誘導実験

12-well plate（BD Falcon）に 2.5×10^5 個の 3T3-L1 細胞を撒き、成熟脂肪細胞へ分化させた。分化誘導 6 日目以降に 5 μg/ml の濃度で rAIM を添加し、目的に応じた期日まで培養した。FAS inhibitor C75（フナコシ）は 25 μM の濃度で用いた。培養後、培養上清および細胞を回収し、その後の実験に用いた。rAIM による Lipolysis 誘導能は、細胞上清中のグリセロール及び遊離脂肪酸含量の測定、ならびに、細胞における *perilipin*、*fsp27*、a*dipophilin* の遺伝子発現量により評価した。なお、コントロールとして、5 μg/ml の濃度で BSA を添加したものを用いた。

グリセロール及び遊離脂肪酸含量の測定

培養上清およびマウス血清中のグリセロール濃度は Glycerol assay kit（Bio Vision Inc.）を用いて測定した。また、培養上清およびマウス血清中の遊離脂肪酸濃度は Free fatty acid assay kit（Bio Vision Inc.）を用いて測定した。実験操作は各 kit に付属のプロトコールに従った。

RNA 抽出および cDNA の作製

細胞および動物組織からの RNA 抽出には TRIzol Reagent（Invitirogen）を用いた。回収した RNA は適当な量の DEPC 水に溶解し、濃度を測定後、total RNA 1μg を cDNA 作製に用いた。total RNA 1 μg を RQ1 RNase-Free DNase（Promega）で 30 分間処理し、混入している可能性のあり DNA を分解し、SuperScript ⅢReverse Transcriptase（Invitorgen）を用いて逆転写反応を行った。実験操作は付属のプロトコールに従った。作製した cDNA は、その一部を 10 倍に希釈して実験に用いた。

リアルタイム PCR（定量 PCR）

遺伝子発現量の定量的解析は、7500 Fast Real-Time PCR system（Applied Bisystems）を用いて、ΔΔCt 法により行った。各遺伝子の発現量は *gapdh* 発現量

で normalization した。PCR 反応溶液の調製には POWER SYBR GREEN PCR MASTER MIX（Applied Biosystems）を使用し、実験操作および機器の操作については、付属のプロトコールに従った。また、リアルタイム PCR に用いたプライマー配列を下記に列挙した。

Name	Sequence (5' - 3')
f-mAIM	GAGGACACATGGATGGAATGT
r-mAIM	ACCCTTGTGTAGCACCTCCA
f-PPARγ1	CAAGAATACCAAAGTGCGATCAA
r-PPARγ1	GAGCTGGGTCTTTTCAGAATAATAAG
f-PPARγ2	CCAGAGCATGGTGCCTTCGCT
r-PPARγ2	CAGCAACCATTGGGTCAGCTC
f-C/EBPα	AGCAACGAGTACCGGGTACG
r-C/EBPα	TGTTTGGCTTTATCTCGGCTC
f-C/EBPβ	GCAAGAGCCGCGACAAG
r-C/EBPβ	GGCTCGGGCAGCTGCTT
f-FAS	GCTGCTGTTGGAAGTCAGC
f-FAS	AGTGTTCGTTCCTCGGAGTG

f-CD36	TTGTACCTATACTGTGGCTAAATGAGA
r-CD36	CTTGTGTTTTGAACATTTCTGCTT
f-GLUT4	GACGGACACTCCATCTGTTG
r-GLUT4	GCCACGATGGAGACATAGC
f-Fsp27	CTGGAGGAAGATGGCACAATCGTG
r-Fsp27	CAGCCAATAAAGTCCTGAGGGTTCA
f-Perilipin	TGCTGGATGGAGACCTC
r-Perilipin	ACCGGCTCCATGCTCCA
f-Adipophilin	AAGCATCGGCTACGACGACAC
r-Adipophilin	GGACAGTCTGGCATGTAGTCTGGA
f-AGTL	GGAGACCAAGTGGAACATCTCA
r-AGTL	AATAATGTTGGCACCTGCTTCA
f-PREF1	CGGGAAATTCTGCGAAATAG
r-PREF1	TGTGCAGGAGCATTCGTACT
f-HSL	TGTGGCACAGACCTCTAAAT
r-HSL	GGCATATCCGCTCTC
f-GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
r-GAPDH	GGATGCAGGGATGATGTTCT

f-F4/80	CCTGGACGAATCCTGTGAAG
r-F4/80	GGTGGGACCACAGAGAGTTG
f-CD11c	GAGCCAGAACTTCCCAACTG
r-CD11c	TCAGGAACACGATGTCTTGG
f-iNOS	CCAAGCCCTCACCTACTTCC
r-iNOS	CTCTGAGGGCTGACACAAGG
f-CD163	CCTGGATCATCTGTGACAACA
r-CD163	TCCACACGTCCAGAACAGTC
f-MR	CCACAGCATTGAGGAGTTTG
r-MR	ACAGCTCATCATTTGGCTCA
f-Arg-1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG
r-Arg-1	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
f-MCP1	CATCCACGTGTTGGCTCA
r-MCP1	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
f-MCP2	TTCTTTGCCTGCTGCTCATA
r-MCP2	AGCAGGTGACTGGAGCCTTA
f-MCP3	TTCTGTGCCTGCTGCTCATA
r-MCP3	TTGACATAGCAGCATGTGGAT

f-CCL5/RANTES	GTGCCCACGTCAAGGAGTAT
r-CCL5/RANTES	TCCTTCGAGTGACAAACACG
f-MIP1α	CAAGTCTTCTCAGCGCCATA
r-MIP1 α	GGAATCTTCCGGCTGTAGG
f-IL1β	TGTAATGAAAGACGGCACACC
r-IL1 β	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
f-IL6	GATGGATGCTACCAAACTGGA
r-IL6	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
f-TNF α	TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG
r-TNF α	GGTCTGGGCCATAGAACTGA

タンパク質抽出

ウエスタンブロット（WB）を目的としたタンパク質抽出を行う際は、細胞および動物組織を Lysis buffer（0.1 % SDS, 1 % NP40, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Complete Mini Protein inhibitor cocktail tablets (Roche), Phosphatase Inhibitor cocktail 1 (Sigma), phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma)）中でホモジナイズし、Lysate を 4 ℃、14000 rpm、20 分間の条件で遠心分離後、上清を回収した。免疫沈降（IP）を目的としたタンパク質抽出を行う

際は、細胞および動物組織を RIPA buffer（1 % NP40, 0.25 % sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Complete Mini Protein inhibitor cocktail tablets, Phosphatase Inhibitor cocktail 1, phosphatase inhibitor cocktail 2）中でホモジナイズし、Lysate を 4 ℃、14000 rpm、20 分間の条件で遠心分離後、上清を回収した。いずれの場合も、タンパク質濃度は BCA Protein Assay kit（Thermo scientific）を用いて測定した。実験操作は付属のプロトコールに従った。

ウエスタンブロット（WB）

WB を目的として抽出したタンパク質に、2 × Sample buffer（0.125 M Tris-HCl, 10 % 2-Mercaptoethanol, 4 % SDS, 0.01 % BPB）を混合し、99 ℃、5 分間の条件で還元した。20 ~ 50 μg のサンプルを、e-PAGEL（ゲル濃度 : 5 ~ 20 %, 10 %, 15 %、アトー株式会社）ゲルにロードし、SDS-PAGE 法により分離した。SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜（Immobilon, Millipore）に転写し、5 ~ 10 % BSA / TBST または 5 ~ 10 % スキムミルク / TBST により室温、1 時間の条件で blocking した。Blocking 溶液で一次抗体を希釈し、4 ℃、overnight の条件で一次抗体反応を行った。本研究で WB に用いた一次抗体の種類と希釈率は次の通りである（カッコ内は抗体希釈率を表す）：抗 AIM 抗体（1:1000）、抗 HA 抗体 HRP conjugated（1:5000）、抗 FLAG 抗体 HRP conjugated （1:5000）、抗βActin 抗体（1:5000）、

抗 FAS 抗体（1:500）、抗 total PKA C-α抗体（1:50000）、抗 phosphorylated at Thr197 PKA C-α抗体（1:1000）、抗 total AMPKα抗体（1:1000）、抗 phosphorylated at Thr172 AMPKα抗体（1:1000）、抗 IκBα抗体（1:1000）、抗 total JNK 抗体（1:1000）、抗 phosphorylated JNK 抗体（1:1000）、抗 total AKT 抗体（1:1000）、抗 phosphorylated AKT 抗体（1:1000）、抗 total GSK3β抗体（1:1000）、抗 phosphorylated GSK3β抗体（1:500）。一次抗体反応後、TBST にて 2 回洗浄し、blocking 溶液で希釈した二次抗体を用いて、室温、1 時間の条件で二次抗体反応を行った。本研究で WB に用いた二次抗体の種類と希釈率は次の通りである（カッコ内は抗体希釈率を表す）：抗 rabbit IgG 抗体 HRP conjugated （1:20000）、抗 mouse IgG 抗体 HRP conjugated （1:20000）。二次抗体反応後、TBST にて 3 回洗浄した。検出試薬として Luminata Forte Western HRP Substrate（Millipore）を用いた。シグナルの検出は、ImageQuant LAS4000（GE Healthcare）を用いた。装置の操作に関しては付属のマニュアルに従った。

免疫沈降法（IP）

IP を目的として抽出したタンパク質に、Protein G Agarose（Sigma）を 10 μl 添加し pre-clear した。pre-clear 後、Anti-HA Affinity Matrix または Anti-FLAG M2-Agarose を 10 ~ 20 μl 添加し、4 ℃、overnight の条件で抗原抗体反応を行っ

た。反応終了後、上清を除去し、1 % BSA / TBST にて 3 回、TBST にて 2 回洗浄した。適当な量の 1 × Sample buffer を添加し、99 ℃、5 分間の条件で還元した後、WB を行い目的のバンドを検出した。

Conditioned Medium（CM）の調製

細胞培養デッィシュ（直径 10cm）上で 3T3-L1 細胞を分化誘導し、培養した。分化誘導 6 日目から、rAIM（25 μg/ml）、C75（25 μM）、Palmitic acid（PA, 100μM）、Stearic acid（SA, 100μM） をそれぞれ添加し、分化誘導 9 日目まで培養し CM を回収した。また、維持培地で分化誘導 6 日目から 9 日目まで培養し回収した CM をコントロールの CM（none-CM）とした。抗 CD36 中和抗体を加えた CM は、分化誘導 5 日目から 10 μg/ml の抗 CD36 中和抗体を単独で作用させ、分化誘導 6 日目から抗 CD36 中和抗体と rAIM を同時に添加し、分化誘導 9 日目まで培養し CM を回収した。10 μg/ml の mouse IgA を含む維持培地で分化誘導 6 日目から 9 日目まで培養し回収した CM を、抗 CD36 中和抗体を加えた CM のコントロールとした。

CM を用いた 3T3-L1 細胞における TLR4 シグナル伝達経路活性化能の評価

6-well plate または 12-well plat 上で 3T3-L1 細胞を分化させ、分化誘導後 12 日

まで培養した。調製した CM を 3T3-L1 細胞を刺激し、0、10、30 分のタイムポイントで細胞を回収し IκBαの分解を WB で評価した。また、同様のタイムポイントで RNA を回収し、炎症性サイトカイン（*IL1β*、*IL6*、*TNFα*）およびケモカイン（*MCP1*、*MCP2*、*MCP3*、*CCL5*/*RANTES*）の遺伝子発現量を解析した。TIRAP inhibitor（Imgenex）は 100 μM で使用し、分化誘導 11 日目からサンプリングまで作用させた。また、ポジティブコントロールとして、100 ng/ml の LPS を作用させた。各 CM による刺激開始から 30 分後に細胞上清を回収しケモカイン量を ELISA で評価した。

ELISA

細胞上清または血清中のホルモン、炎症性サイトカイン、ケモカイン濃度は ELISA により測定した。本研究で用いた ELISA kit は次のとおりである：Insulin（Mercodia）、IL6（R&D systems）、TNFα（シバヤギ）、MCP-1（Thermo Scientific）、MCP-2（Immuno-Biological Laboratories）、MCP-3（eBioscience）、CCL5/RANTES（eBioscience）。実験操作は付属のプロトコールに従った。

Macrophage Chemotaxis Assay

macrophage chemotaxis assay には、CytoSelect 96-well Cell migration Assay Kit（Cell

Biolabs.）を用いた。1 × 10^6 個の RAW264.7 細胞を上部チャンバーに播き、下部チャンバーを各種 CM で満たした後、37 ℃、5 時間の培養条件で培養した。また、ポジティブコントロールとして 100 ng / ml の recombinant MCP1（BETHYL）を用いた。CyQuant GR dye を含む Lysis buffer で細胞を溶解し、Ex / Em = 480 nm / 520 nm の条件で蛍光強度（RFU）を測定した。蛍光強度測定のためのプレートリーダーは、MULTISKAN GO（Thermo Scientific）を用いた。

3T3-L1 細胞への siRNA transfection

ON-TARGET plus siTLR4 および Non-Targeting siRNA は Thermo Scientific より購入した。siRNA 導入試薬は、X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent（Roche）を用いた。実験操作は付属のプロトコールに従い、分化誘導後 8 日目まで培養した 3T3-L1 細胞に 150 nM の各 siRNA を導入した。

高脂肪食（HFD）負荷マウスの経時的解析

$AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスは 8 ~ 10 週齢まで CE-2 で飼育した後、HFD 負荷を行った。HFD 負荷期間は、0、6、12、20 週間とした。各タイムポイントにおいて、マウスの体重、皮下脂肪量、内臓脂肪量の測定、組織サンプリング（精巣上体脂肪）、採血を行った。採血は開腹後、腹部大静脈から行い、Microtainer（BD）

を用いて血清を得た。組織は、心臓からの PBS 還流により十分に脱血処理を施したのち摘出し、液体窒素中で迅速に凍結し実験に用いた。

凍結切片の作製

マウス 1 匹につき、10 U/ml のヘパリンを 300 μl 腹腔内投与し、ヘパリン化した。Avertin（0.5 g Tribromoethanol, 0.25 g 2-methyl 2-butanol / 40 ml H_2O）を 20 ml / Kg body weight の投与量で腹腔内投与し、マウスを麻酔した。麻酔深度が十分であることを確認し、開胸して心臓を露出させた。右心耳に割を入れ、左心室から 1 U /ml ヘパリン/ PBS を 5 分間還流させ脱血した。脱血終了後、還流液を 4 % PFA / PBS に切り替え、1 時間還流し固定した。精巣上体脂肪を摘出し、適当な大きさに分割したのち、4% PFA/PBS により浸漬固定した。固定終了後、10 % Sucrose、20 % Sucrose、30 %Sucrose に段階置換した。組織を適切な形状にトリミングし、Tissue-Tek O.C.T. compound（Sakura Finetek Japan）を用いて包埋し、ドライアイス/ヘキサン中で急速凍結した。作製した凍結ブロックは、凍結ミクロトーム（LEICA CM3050S, LEICA）を用いて 10 μm 厚に薄切し、実験に用いた。装置の操作については付属のマニュアルに従った。

Hematoxylin – Eosin（HE）染色

凍結切片を MilliQ 水で 2 回洗浄し Tissue-Tek O.C.T. compound を除去した。Hematoxylin（武藤化学）を用いて、室温、5 分間の条件で染色後、流水で 10 分間洗浄した。Eosin（Sigma）を用いて、室温、1 分間の条件で染色した。染色後、70 % ethanol、80 % ethanol、90 % ethanol、100 % Ethanol、xylene の順に置換し組織の脱水を行った。脱水後、Malinol（武藤化学）を用いて封入し、検鏡した。

免疫組織化学（IHC）

凍結切片を MilliQ 水で 2 回洗浄し Tissue-Tek O.C.T. compound を除去した。5 % BSA / TBST または 5 % normal goat serum / TBST で、湿潤箱中、室温、1 時間の条件で Blocking を行った。Mouse on mouse の染色条件となる場合、30 μg / ml の AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG（Jackson Immuno Research）を用いて、湿潤箱中、室温、30 分間の条件で処理した。Blocking 溶液で一次抗体を希釈し、湿潤箱中、4 ℃、overnight の条件で一次抗体反応を行った。本研究で免疫組織化学に用いた一次抗体の種類と希釈率は次の通りである（カッコ内は抗体希釈率を表す）: 抗 AIM 抗体（1:400）、抗 F4/80 抗体（1:200）、抗 IL6 抗体（1:300）、抗 Mannose Receptor（MR）抗体（1:100）、抗 MCP1 抗体（1:200）。一次抗体反応後、TBST にて 2 回洗浄し、blocking 溶液で希釈した二次抗体を湿潤箱中、室

温、遮光、1 時間の条件で反応させた。本研究で免疫組織化学に用いた二次抗体の種類と希釈率は次の通りである（カッコ内は抗体希釈率を表す）: 抗 rat IgG 抗体 Alexa Fluor 488（1:500）、抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 594（1:1000）、抗 mouse IgG 抗体 Alexa Fluor 488 （1:1000）。二次抗体反応終了後、TBST にて 3 回洗浄した。洗浄後、1 μg/ml の Hoechst 33258（Sigma）を用いて、室温、5 分間の条件で核染色を行った。核染色終了後、TBST にて 2 回、TBS で 1 回洗浄し、退色防止剤含有水系封入剤 ProlongGold（Invitorgen）を用いて封入した。封入後、共焦点顕微鏡による観察を行った。

AIM$^{-/-}$および TLR4$^{-/-}$マウスへの rAIM 投与実験

8 ~ 10 週齢まで飼育した AIM$^{-/-}$マウスに対して、300 ug / マウスの投与量で腹腔内投与した。投与回数は 1 週間に 2 回とし、これを 5 週間続けた。また、等量の BSA を rAIM と同様の方法で投与し、これをコントロールとした。rAIM 投与群および BSA 投与群は投与開始と同時に HFD 負荷を施し、1 週間ごとに体重を測定した。規定の投与期間終了後、解剖し、脂肪組織重量の測定、精巣上体脂肪のサンプリング、採血を行い、それらを実験に使用した。

8 ~ 10 週齢まで飼育した TLR4$^{+/+}$および TLR4$^{-/-}$マウスに対して、300 ug / マウスの投与量で腹腔内投与した。投与回数は 1 週間に 3 回とし、これを 1 週間続け

た。また、等量の BSA を rAIM と同様の方法で投与し、これをコントロールとした。規定の投与期間終了後、解剖し、精巣上体脂肪のサンプリング、採血を行い、それらを実験に使用した。

基礎代謝パラメーターの解析

HFD を 20 週間負荷した $AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスの食餌量、酸素消費量、体温、自発行動活性は既報の方法に従って測定した［124］。

FAS activity assay

FAS 酵素活性は既報の方法を改変して測定した［125］。必要な処理を施した 3T3-L1 細胞を回収し、homogenize buffer（3 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose, pH 7.2）中で超音波破砕した。14000 rpm、4 ℃、20 分間の条件で遠心分離し細胞残屑を除去した後、BCA 法にてタンパク質濃度を測定し、酵素源とした。測定用キュベット（容量 1 ml、光路長 1 cm）中で 0.1 ml の酵素源と 0.97 ml FAS 酵素活性測定溶液（0.1 M potassium phosphate, 0.3 mM NADPH, 0.05 mM acetyl CoA, pH 7.0）を転倒混和により混合した。30 ℃に保温した恒温ホルダーに測定用キュベットを設置し、340 nm の波長でブランク反応をチェースした。内在性基質による NADPH の消費の影響を除外するため、OD_{340} 値の減少率が一

定になるまでチェースを続けた。ブランク反応時の OD_{340} 値の減少率が一定になったことを確認後、0.2 mM maronyl CoA を 0.02 ml 添加し、FAS 酵素反応を開始した。OD_{340} 値の減少率が一定になるまでチェースし、FAS 酵素活性を測定した。FAS 酵素活性は、nmol NADPH / min / mg protein の単位で算出した。なお、FAS 酵素活性の算出に必要な NADPH の分子吸光経数は次の値を用いた。NADPH 分子吸光係数：6220 $M^{-1}cm^{-1}$

Stromal-Vascular cell Fraction（SVF）および脂肪細胞の単離

マウス 1 匹につき、10 U/ml のヘパリンを 300 μl 腹腔内投与し、ヘパリン化した。Avertin を 20 ml / Kg body weight の投与量で腹腔内投与し、マウスを麻酔した。麻酔深度が十分であることを確認し、開胸して心臓を露出させた。右心耳に割を入れ、左心室から 1 U /ml ヘパリン/ PBS を 5 分間還流させ脱血した。脱血後、精巣上体脂肪を摘出し、1 ~ 2 mm 程度の小片になるまで細かく裁断した。1 U /ml ヘパリン / PBS で洗浄し、組織中に残存した血球を除去した。1000 g、室温、5 分間の条件で遠心分離し、浮遊して層を形成した脂肪組織を回収した。回収した脂肪組織は、2 mg / ml の type Ⅱ Collagenase（Calbiochem）を含む PBS 中で、37 ℃、30 分間の条件でインキュベートした。1000 g、室温、5 分間の条件で遠心分離し、沈殿した SVF および浮遊して層を形成した脂肪細胞を回収し

た。回収した SVF および脂肪細胞は、5 % FBS を含む PBS で 2 回洗浄し、実験に用いた。

Glucose tolerance test（GTT）

HFD を 0 週間および 12 週間負荷した $AIM^{+/+}$ならびに $AIM^{-/-}$マウスを用いた。自由飲水下、16 時間の絶食後、グルコースを 3 g / kg の投与量で腹腔内投与し、0、30、60、90、120 分後に血糖測定機器アセンシアブリーズ（Bayer Health Care）を用いて血糖値を測定した。血糖値測定の際の採血は、尾静脈をメスで傷つけることにより行った。血糖値が血糖測定機器の上限を超えた場合は、ヘパリン / PBS で採取した血液を希釈し測定した。また、GTT の際の血中インスリン濃度は、インスリン ELISA Kit（Mercodia）を用いて測定した。

Insulin tolerance test（ITT）

HFD を 0 週間および 12 週間負荷した $AIM^{+/+}$ならびに $AIM^{-/-}$マウスを用いた。自由飲水下、5 時間の絶食後、インスリン（Humulin R, 日本イーライリリー）を 0.75 U / kg の投与量で腹腔内投与し、0、30、60、90、120 分後に血糖測定機器アセンシアブリーズ（Bayer Health Care）を用いて血糖値を測定した。血糖値測定の際の採血は、尾静脈をメスで傷つけることにより行った。

インスリン分泌能の解析

HFD を 12 週間負荷した AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスを実験に用いた。マウスを屠殺後、速やかに脱血した。膵臓を露出させ十二指腸下部をクランプした後、総胆管穿刺により type Ⅴ collaggenase（Sigma）を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer を 2 ml 投与した。膨張した膵臓を摘出し、type Ⅴ collaggenase（Sigma）を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer 中で、37 ℃、30 分間の条件でインキュベートした。ピペッティングにより膵臓を完全に崩し、室温、800 g、5 分間の条件で遠心分離した。上清を除去し、Krebs-Ringer bicarbonate buffer で洗浄し、室温、800 g、5 分間の条件で遠心分離した。この操作を 2 回繰り返した後、実体顕微鏡下で膵島（ランゲルハンス島）を単離した。単離した膵島は、2.8 mM glucose (basal glucose concentration) を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer 中で、37 ℃、5 % CO_2、1 時間の条件で前培養した。前培養後、5.6 mM glucose および 20 mM glucose を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer 中、37 ℃、5 % CO_2、30 分間の条件で培養した。培養後、上清を回収し、インスリン濃度を ELISA によって測定した。

インスリンシグナル伝達経路の解析

HFD を 12 週間負荷した AIM$^{+/+}$および AIM$^{-/-}$マウスを実験に用いた。自由飲水

下、5 時間の絶食後、インスリンを 1 U / kg の投与量で腹腔内投与した。15 分後、マウスを屠殺し、脱血したのち、速やかに精巣上体脂肪、肝臓、腓腹筋を摘出した。摘出した組織からタンパク質を抽出し、WB によりインスリンシグナル伝達経路の活性化を評価した。

TUNEL 染色

HFD を 12 週間負荷した $AIM^{+/+}$および $AIM^{-/-}$マウスを実験に用いた。脂肪組織の摘出、組織切片の作製、染色操作、検鏡はジェノスタッフ株式会社に依頼した。

統計解析

結果は、Mann-Whitney 検定（U 検定）により統計処理した。$P < 0.05$ を有意差ありとした。

【引用文献】

1. Matsuzawa Y. Pathophysiology and molecular mechanisms of visceral fat syndrome: the Japanese experience. Diabetes Metab. Rev. 13(1):3-13. 1997
2. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes. 37(12):1595-607. 1988
3. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. Arch. Intern. Med. 149(7):1514-20. 1989
4. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care. 14(3):173-94. 1991
5. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 285(19):2486-97. 2001
6. Nakamura T, Tsubono Y, Kameda-Takemura K, Funahashi T, Yamashita S, Hisamichi S, Kita T, Yamamura T, Matsuzawa Y; Group of the Research for the

Association between Host Origin and Atherosclerotic Diseases under the Preventive Measure for Work-related Diseases of the Japanese Labor Ministry. Magnitude of sustained multiple risk factors for ischemic heart disease in Japanese employees: a case-control study. Jpn. Circ. J. 65(1):11-7. 2001

7. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB, Beeson WL, Clipp SL, English DR, Folsom AR, Freedman DM, Giles G, Hakansson N, Henderson KD, Hoffman-Bolton J, Hoppin JA, Koenig KL, Lee IM, Linet MS, Park Y, Pocobelli G, Schatzkin A, Sesso HD, Weiderpass E, Willcox BJ, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Willett WC, Thun MJ. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. N. Engl. J. Med. 363(23):2211-9. 2010

8. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. JAMA. 298(17):2028-37. 2007

9. Zheng W, McLerran DF, Rolland B, Zhang X, Inoue M, Matsuo K, He J, Gupta PC, Ramadas K, Tsugane S, Irie F, Tamakoshi A, Gao YT, Wang R, Shu XO, Tsuji I, Kuriyama S, Tanaka H, Satoh H, Chen CJ, Yuan JM, Yoo KY, Ahsan H, Pan WH, Gu D, Pednekar MS, Sauvaget C, Sasazuki S, Sairenchi T, Yang G, Xiang YB,

Nagai M, Suzuki T, Nishino Y, You SL, Koh WP, Park SK, Chen Y, Shen CY, Thornquist M, Feng Z, Kang D, Boffetta P, Potter JD. Association between body-mass index and risk of death in more than 1 million Asians. N. Engl. J. Med. 364(8):719-29. 2011

10. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 259(5091):87-91.1993

11. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science. 271(5249):665-8. 1996

12. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J. Clin. Invest. 112(12):1796-808. 2003

13. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J. Clin. Invest. 112(12):1821-30. 2003

14. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 444(7121):860-7.

2006

15. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. Annu .Rev. Physiol. 72:219-46. 2010

16. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J. Clin. Invest. 116(7):1793-801. 2006

17. Odegaard JI, Chawla A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 4(11):619-26. 2008

18. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. J. Clin. Invest. 121(6):2111-7. 2011

19. Ferrante AW Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. J. Intern. Med. 262(4):408-14. 2007

20. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. J. Leukoc. Biol. 88(1):33-9. 2010

21. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. Curr. Opin. Lipidol. 14(6):561-6. 2003

22. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 372(6505):425-32. 1994

23. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature. 409(6818):307-12. 2001

24. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Trends. Endocrinol. Metab. 11(6):212-7. 2000

25. Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, Juhan-Vague I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. Diabetes. 46(5):860-7. 1997

26. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83(3):847-50. 1998

27. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, Maachi M, Quignard-Boulangé A, Capeau J, Caron M. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. Diabetologia. 49(9):2162-73. 2006

28. Trøseid M, Seljeflot I, Arnesen H. The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome. Cardiovasc. Diabetol. 9:11. 2010

29. Leick L, Lindegaard B, Stensvold D, Plomgaard P, Saltin B, Pilegaard H. Adipose tissue interleukin-18 mRNA and plasma interleukin-18: effect of obesity and

exercise. Obesity. 15(2):356-63. 2007

30. Bruun JM, Stallknecht B, Helge JW, Richelsen B. Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. Eur. J .Endocrinol. 157(4):465-71. 2007

31. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J. Clin. Invest. 116(1):115-24. 2006

32. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. J. Clin. Invest. 116(6):1494-505. 2006

33. Ito A, Suganami T, Yamauchi A, Degawa-Yamauchi M, Tanaka M, Kouyama R, Kobayashi Y, Nitta N, Yasuda K, Hirata Y, Kuziel WA, Takeya M, Kanegasaki S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. J. Biol. Chem. 283(51):35715-23. 2008

34. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. Trends. Endocrinol. Metab. 13(2):84-9. 2002

35. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. Gene. 190(2):227-35. 1997

36. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). Biochem. Biophys. Res. Commun. 221(2):286-9. 1996

37. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J. Biol. Chem. 270(45):26746-9. 1995

38. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. J. Biochem. 120(4):803-12. 1996

39. Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, Akasaki Y, Shimono A, Walsh K. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. Science. 329(5990):454-7. 2010

40. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome.

Circ. J. 68(11):975-81. 2004

41. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20(6):1595-9. 2000

42. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat. Med. 7(8):941-6. 2001

43. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. Nat. Med. 8(7):731-7. 2002

44. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr. Rev. 26(3):439-51. 2005

45. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 423(6941):762-9. 2003

46. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. Nature. 464(7293):1313-9. 2010

47. Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N, Maeda K, Shibata R, Walsh K, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. Hypertension. 47(6):1108-16. 2006

48. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh

K. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. J. Biol. Chem. 2004 279(2):1304-9.

49. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. Circulation. 103(8):1057-63. 2001

50. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. Lancet. 360(9326):57-8. 2002

51. Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. Annu. Rev. Pathol. 6:275-97. 2011

52. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J. Clin. Invest. 117(1):175-84. 2007

53. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A.

Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. Nature. 447(7148):1116-20. Epub 2007 May 21 2007.

54. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. Diabetes. 57(12):3239-46. 2008

55. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat. Rev. Immunol. 3(1):23-35. 2003

56. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat. Rev. Immunol. 5(12):953-64. 2005

57. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends. Immunol. 25(12):677-86. 2004

58. Könner AC, Brüning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. Trends. Endocrinol. Metab. 22(1):16-23. 2011

59. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, Peiretti F, Verdier M, Juhan-Vague I, Tanti JF, Burcelin R, Alessi MC. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. Diabetologia.

50(6):1267-76. 2007

60. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, Rensen PC, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, Kersten S, Müller M, van den Berg WB, van Rooijen N, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JW, Kanneganti T, Tack CJ, Netea MG. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. Cell Metab. 12(6):593-605. 2010

61. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. Nat. Med. 17(2):179-88. 2011

62. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, Ting JP. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat. Immunol. 12(5):408-15. 2011

63. Hirata A, Maeda N, Hiuge A, Hibuse T, Fujita K, Okada T, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. Cardiovasc. Res. 84(1):164-72. 2009

64. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, Lumeng CN, Mortensen RM. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage

polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. J. Clin. Invest. 120(9):3350-64. 2010

65. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes. 56(8):1986-98. 2007

66. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J. Clin. Invest. 116(11):3015-25. 2006

67. Saberi M, Woods NB, de Luca C, Schenk S, Lu JC, Bandyopadhyay G, Verma IM, Olefsky JM. Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. Cell Metab. 10(5):419-29. 2009

68. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and

insulin resistance. J. Biol. Chem. 281(36):26602-14. 2006

69. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat. Med. 15(8):921-9. 2009

70. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat. Med. 15(8):914-20. 2009

71. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN, Leong HX, Glassford A, Caimol M, Kenkel JA, Tedder TF, McLaughlin T, Miklos DB, Dosch HM, Engleman EG. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. Nat. Med. 17(5):610-7. 2011

72. Miyazaki T, Hirokami Y, Matsuhashi 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 cysteine-rich domain superfamily. J. Exp. Med. 189(2):413-22. 1999

73. Sarrias MR, Padilla O, Monreal Y, Carrascal M, Abian J, Vives J, Yélamos J, Lozano F. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpha. Tissue Antigens. 63(4):335-44. 2004

74. Kuwata K, Watanabe H, Jiang SY, Yamamoto T, Tomiyama-Miyaji C, Abo T, Miyazaki T, Naito M. AIM inhibits apoptosis of T cells and NKT cells in Corynebacterium-induced granuloma formation in mice. Am. J. Pathol. 162(3):837-47. 2003

75. Haruta I, Kato Y, Hashimoto E, Minjares C, Kennedy S, Uto H, Yamauchi K, Kobayashi M, Yusa S, Müller U, Hayashi N, Miyazaki T. Association of AIM, a novel apoptosis inhibitory factor, with hepatitis via supporting macrophage survival and enhancing phagocytotic function of macrophages. J. Biol. Chem. 276(25):22910-4. 2001

76. Zou T, Garifulin O, Berland R, Boyartchuk VL. Listeria monocytogenes infection induces prosurvival metabolic signaling in macrophages. Infect. Immun. 79(4):1526-35. 2011

77. Shin SC, Kang YM, Kim HS. Life span and thymic lymphoma incidence in high- and low-dose-rate irradiated AKR/J mice and commonly expressed genes. Radiat. Res. 174(3):341-6. 2010

78. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, Hogenesch J, O'connell RM, Cheng G, Saez E, Miller JF, Tontonoz P. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. Cell. 119(2):299-309. 2004

79. Valledor AF, Hsu LC, Ogawa S, Sawka-Verhelle D, Karin M, Glass CK. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101(51):17813-8. 2004

80. Lian X, Yan C, Qin Y, Knox L, Li T, Du H. Neutral lipids and peroxisome proliferator-activated receptor-{gamma} control pulmonary gene expression and inflammation-triggered pathogenesis in lysosomal acid lipase knockout mice. Am. J. Pathol. 167(3):813-21. 2005

81. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31(7):1506-16. 2011

82. Arai S, Shelton JM, Chen M, Bradley MN, Castrillo A, Bookout AL, Mak PA, Edwards PA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Miyazaki T. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development. Cell Metab. 1(3):201-13. 2005

83. Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, Zitzmann N. Novel serum biomarker

candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. Clin. Chem. 53(10):1792-9. 2007

84. Gray J, Chattopadhyay D, Beale GS, Patman GL, Miele L, King BP, Stewart S, Hudson M, Day CP, Manas DM, Reeves HL. A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease. BMC Cancer. 9:271. 2009

85. Kim WK, Hwang HR, Kim do H, Lee PY, In YJ, Ryu HY, Park SG, Bae KH, Lee SC. Glycoproteomic analysis of plasma from patients with atopic dermatitis: CD5L and ApoE as potential biomarkers. Exp. Mol. Med. 40(6):677-85. 2008

86. Yu HR, Kuo HC, Sheen JM, Wang L, Lin IC, Wang CL, Yang KD. A unique plasma proteomic profiling with imbalanced fibrinogen cascade in patients with Kawasaki disease. Pediatr. Allergy. Immunol. 20(7):699-707. 2009

87. Kolialexi A, Anagnostopoulos AK, Papantoniou N, Vougas K, Antsaklis A, Fountoulakis M, Mavrou A, Tsangaris GT. Potential biomarkers for Turner in maternal plasma: possibility for noninvasive prenatal diagnosis. J. Proteome. Res. 9(10):5164-70. 2010

88. Hung PH, Chen YW, Cheng KC, Chou HC, Lyu PC, Lu YC, Lee YR, Wu CT, Chan HL. Plasma proteomic analysis of the critical limb ischemia markers in diabetic

patients with hemodialysis. Mol. Biosyst. 7(6):1990-8. 2011

89. Yusa S, Ohnishi S, Onodera T, Miyazaki T. AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF-beta1. Eur. J. Immunol. 29(4):1086-93. 1999

90. Sarrias MR, Roselló S, Sánchez-Barbero F, Sierra JM, Vila J, Yélamos J, Vives J, Casals C, Lozano F. A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. J. Biol. Chem. 280(42):35391-8. 2005

91. Oh JH, Yang MJ, Heo JD, Yang YS, Park HJ, Park SM, Kwon MS, Song CW, Yoon S, Yu IJ. Inflammatory response in rat lungs with recurrent exposure to welding fumes: a transcriptomic approach. Toxicol. Ind. Health. 5. 2011

92. Li Y, Qu P, Wu L, Li B, Du H, Yan C. Api6/AIM/Spα/CD5L overexpression in alveolar type II epithelial cells induces spontaneous lung adenocarcinoma. Cancer Res. 71(16):5488-99. 2011

93. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. Blood. 80(5):1105-15. 1992

94. Ibrahimi A, Abumrad NA. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 5(2):139-45. 2002

95. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. J. Biol. Chem. 274(27):19055-62. 1999

96. Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. FASEB J. 8(15):1248-59. 1994

97. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil SJ. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 100(11):6358-63. 2003

98. Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., and Kuhajda, F.P. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. Science 288, 2379-2381. 2000.

99. Makimura, H., Mizuno, T.M., Yang, X.J., Silverstein, J., Beasley, J., and Mobbs, C.V.. Cerulenin mimics effects of leptin on metabolic rate, food intake, and body weight independent of the melanocortin system, but unlike leptin, cerulenin fails to block neuroendocrine effects of fasting. Diabetes 50, 733-739. 2001

100. Kumar, M.V., Shimokawa, T., Nagy, T.R., and Lane, M.D.. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A. 99, 1921-1925. 2002

101. Mobbs, C.V., and Makimura, H. Block the FAS, lose the fat. Nat. Med. 8, 335-336. 2002

102. Shimokawa, T., Kumar, M.V., and Lane, M.D.. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 66-71. 2002

103. Kovacs, P., Harper, I., Hanson, R.L., Infante, A.M., Bogardus, C., Tataranni, P.A., and Baier, L.J. A novel missense substitution (Val1483Ile) in the fatty acid synthase gene (FAS) is associated with percentage of body fat and substrate oxidation rates in nondiabetic Pima Indians. Diabetes 53, 1915-1919. 2004

104. Liu, L.H., Wang, X.K., Hu, Y.D., Kang, J.L., Wang, L.L., and Li, S. Effects of a fatty acid synthase inhibitor on adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. Acta. Pharmacol. Sin. 25, 1052-1057. 2004

105. Ronnett, G.V., Kim, E.K., Landree, L.E., and Tu, Y. Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. Physiol. Behav. 85, 25-35. 2005

106. Schmid, B., Rippmann, J.F., Tadayyon, M., and Hamilton, B.S. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 328, 1073-1082. 2005

107. Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R., Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. Cell 138, 476-488. 2009

108. Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. Mol. Cell 3, 151-158. 1999

109. Holm, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Biochem. Soc. Trans. 31, 1120-1124. 2003

110. Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S. Regulation of lipolysis in adipocytes. Annu. Rev. Nutr. 27, 79-101. 2007

111. Zechner, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Lass, A., and Zimmermann, R. Lipolysis: pathway under construction. Curr. Opin. Lipidol. 16, 333-340. 2005

112. Jenkins KA, Mansell A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Cytokine 49:237-244. 2010

113. Olsnes, S., Klingenberg, O., and Wiedłocha, A. Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus. Physiol. Rev. 83, 163-182. 2003.

114. Mindell JA, Silverman JA, Collier RJ, Finkelstein A. Structure-function relationships in diphtheria toxin channels: III. Residues which affect the cis pH dependence of channel conductance. J. Membr. Biol. 137(1):45-57. 1994

115. Hughes EA, Hammond C, Cresswell P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94(5):1896-901. 1997

116. Kopito RR. ER quality control: the cytoplasmic connection. Cell. 88(4):427-30. 1997

117. Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93(24):13797-801. 1996

118. Wesche J, Rapak A, Olsnes S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. J. Biol. Chem. 274(48):34443-9. 1999

119. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Cell. 84(5):769-79. 1996

120. Wesche, J., Małecki, J., Wiedłocha, A., Skjerpen, C.S., Claus, P., and Olsnes, S.

FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus. J. Biol. Chem. 281, 11405-11412. 2006

121. Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., and Hung, M.C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. Nat. Cell Biol. 3, 802-808. 2001.

122. Kim EK, Miller I, Landree LE, Borisy-Rudin FF, Brown P, Tihan T, Townsend CA, Witters LA, Moran TH, Kuhajda FP, Ronnett GV. Expression of FAS within hypothalamic neurons: a model for decreased food intake after C75 treatment. Am J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283(5) . 2002

123. Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism. Int.. J. Obes. 32, Suppl 7:S39-51. 2008

124. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. Cell Metab. 10(3):178-88. 2009

125. Kelley DS, Nelson GJ, Hunt JE. Effect of prior nutritional status on the activity of

lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. Biochem. J. 235(1):87-90. 1986

126. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. J. Clin. Invest. 118(8):2808-21. 2008

127. Ranjit S, Boutet E, Gandhi P, Prot M, Tamori Y, Chawla A, Greenberg AS, Puri V, Czech MP. Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF-α to control lipolysis in murine adipocytes. J. Lipid Res. 52(2):221-36. 2011

128. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. Nat Rev Immunol. 9(4):259-70. 2009

129. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. Nat Rev Immunol. 11(11):738-49. 2011

130. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. J. Clin. Invest.

105(8):1049-56. 2000

131. Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE, Febbraio M. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. Cardiovasc. Res. 89(3):604-13. 2011

132. Tomiyama Y, Take H, Ikeda H, Mitani T, Furubayashi T, Mizutani H, Yamamoto N, Tandon NN, Sekiguchi S, Jamieson GA, et al. Identification of the platelet-specific alloantigen, Naka, on platelet membrane glycoprotein IV. Blood 75(3):684-7. 1990

133. Yamamoto N, Ikeda H, Tandon NN, Herman J, Tomiyama Y, Mitani T, Sekiguchi S, Lipsky R, Kralisz U, Jamieson GA. A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka- platelets lack detectable GPIV (CD36). Blood 76(9):1698-703. 1990

134. Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Yamazaki H, Tanoue K. Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. Blood 83(2):392-7. 1994

135. Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36 deficiency associated with insulin resistance. Lancet. 357(9257):686-7. 2001

136. Yanai H, Chiba H, Morimoto M, Jamieson GA, Matsuno K. Type I CD36

deficiency in humans is not associated with insulin resistance syndrome. Thromb. Haemost. 83(5):786. 2000

137. Martínez VG, Moestrup SK, Holmskov U, Mollenhauer J, Lozano F. The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. Pharmacol. Rev. 63(4):967-1000. 2011

138. de Villiers WJ, Smart EJ. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. J. Leukoc. Biol. 66(5):740-6. 1999

139. Connelly MA, Williams DL. Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. Curr. Opin. Lipidol. 15(3):287-95. 2004

140. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. J. Biol. Chem. 269(33):21003-9. 1994

141. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271(5248):518-20. 1996

142. Peng Y, Akmentin W, Connelly MA, Lund-Katz S, Phillips MC, Williams DL. Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between

cells and high-density lipoprotein. Mol. Biol. Cell 15(1):384-96. 2004

143. Van Eck M, Twisk J, Hoekstra M, Van Rij BT, Van der Lans CA, Bos IS, Kruijt JK, Kuipers F, Van Berkel TJ. Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. J. Biol. Chem. 278(26):23699-705. 2003

144. Zhang W, Yancey PG, Su YR, Babaev VR, Zhang Y, Fazio S, Linton MF. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 108(18):2258-63. 2003

145. Covey SD, Krieger M, Wang W, Penman M, Trigatti BL. Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23(9):1589-94. 2003

146. Daviet L, McGregor JL. Vascular biology of CD36: roles of this new adhesion molecule family in different disease states. Thromb. Haemost. 78(1):65-9. 1997

147. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. J. Clin. Invest. 108(6):785-91. 2001

148. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ. Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell 82(1):77-87. 1995

149. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H. Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. J. Biol. Chem. 276(5):3195-202. 2001

150. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. J. Biol. Chem. 268(16):11811-6. 1993

151. Englyst NA, Taube JM, Aitman TJ, Baglin TP, Byrne CD. A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation. Diabetes 52(5):1248-55. 2003

152. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. J. Biol. Chem. 268(24):17665-8. 1993

153. Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. J. Biol. Chem. 270(27):16221-4. 1995

154. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. J. Biol. Chem. 277(41):38503-16. 2002

【謝辞】

本研究は、東京大学大学院医学系研究科　分子細胞生物学専攻　疾患生命工学センター　分子病態医科学部門にて行われました。

当研究室の宮崎徹教授には、非常に恵まれた環境で研究をさせて頂いただけではなく、論理的な思考から詳細な実験手法に至るまで、研究に必要な全ての事柄について多大な御指導御鞭撻を賜りました。深甚なる感謝の意を表します。また、当研究室の新井郷子講師、中島克彦助教には研究全般に渡り多大な御助言を頂きました。深く感謝致します。

東京大学大学院医学系研究科　内科学専攻　生体防御腫瘍内科学講座　代謝・栄養病態学教室の門脇孝教授、窪田直人先生には、糖・脂質代謝研究について適切な御助言を頂きました。心から感謝の意を表します。

財団法人かずさ DNA 研究所の小原收博士には、FAS のクローニングや IP-MS による網羅的解析など多岐に渡り多大な御指導を賜りました。深く感謝致します。

北海道大学大学院医学系研究科　生理系　解剖学講座　組織細胞学分野の岩永敏彦教授には、免疫電子顕微鏡観察について御指導御鞭撻を賜りました。心から感謝致します。

熊本大学大学院生命科学研究部　先端生命医療科学部門　成育再建・移植医学講座　分子遺伝学分野の尾池雄一教授には、基礎代謝パラメーターの測定に関して多大な御指導御鞭撻を賜りました。深く感謝致します。

Cleveland Clinic Foundation, Lerner Research Institute の Maria Febbraio 博士には、CD36 ノックアウトマウスの組織を供与して頂きました。心から深く感謝致します。

最後に、日々の研究において多くのご支援を頂きました分子病態医科学部門の皆様に深く感謝致します。