

総 説（第18回徳島医学会賞受賞論文）

Cbl-b 欠損によるマクロファージの活性化を介した耐糖能異常

平 坂 勝 也, 河 野 尚 平, 加 川 祥 子, 中 尾 玲 子, 不老地 治 美,
岸 恭 一, 二 川 健

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部栄養医科学講座生体栄養学分野

（平成19年5月8日受付）

（平成19年5月15日受理）

はじめに

インスリン抵抗性はⅡ型糖尿病における中心的な病態であり、その主な原因の一つとして肥満、特に内臓脂肪型肥満が知られている¹⁾。肥満によるインスリン抵抗性はⅡ型糖尿病だけでなく高血圧、脂質代謝異常などの病態が重複したメタボリックシンドロームを引き起こす。近年、その基盤病態として脂肪組織における慢性的な軽度の炎症反応が注目されている^{2,3)}。今回は、われわれが行ってきた Cbl-b 欠損によるマクロファージの活性化を介した耐糖能異常に関する研究について総説したい。

マクロファージにおける Cbl-b (Casitas B-lineage lymphoma b) の役割

Cbl-b はマクロファージや T 細胞の成熟、活性化に関与するユビキチンリガーゼである^{4,5)}。Cbl-b はマクロファージ由来細胞株の HL60, U937 が単球からマクロファージへと分化する際に発現が増大する遺伝子として見出された⁴⁾。Cbl-b は機能ドメインとして、N 末端側からチロシンキナーゼ結合ドメイン、RING フィンガードドメイン、プロリンリッチドメインそしてロイシンジッパードメインを有する（図1）。RING フィンガードドメインは Cbl-b がユビキチンリガーゼとして働く際に重要なドメインであり、プロリンリッチドメインは GDP/GTP 変換因子である Vav1 と結合する際に必要なドメインである。Cbl-b の強発現は Vav1 をユビキチン化し、分解することによって、Vav シグナル伝達経路を抑制し、JNK などの下流シグナルを負へと調節する。実際に、Cbl-b は T 細胞受容体 (TCR) を介した Vav1 の活性化を選択的に抑制することにより CD28 依存性の T 細胞

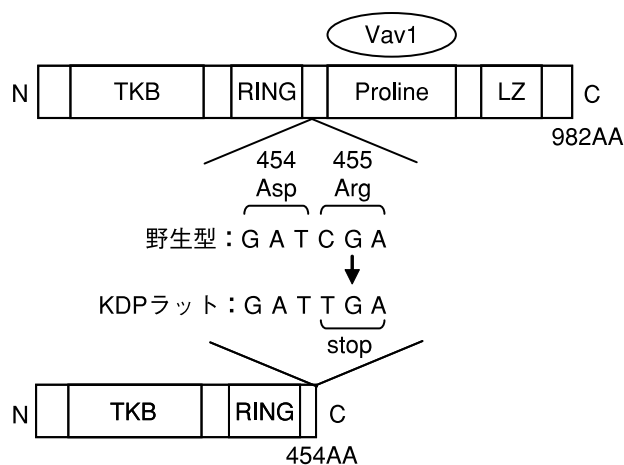


図1 Cbl-b の構造と KDP ラットにおける遺伝子変異

TKB：チロシンキナーゼ結合ドメイン

RING：RING フィンガードドメイン

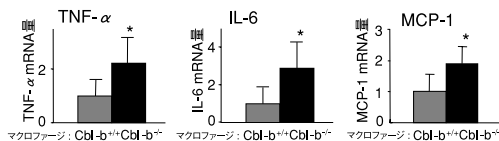
Proline：プロリンリッチドメイン

LZ：ロイシンジッパー

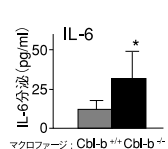
（横井ら Nature Genet 31：391-394, 2002より改変）

活性化を制御することが報告されている⁶⁻⁸⁾。興味深いことに、Cbl-b 遺伝子欠損マウス (Cbl-b^{-/-}マウス) の腹腔マクロファージは野生型マウス (Cbl-b^{+/+}マウス) の腹腔マクロファージと比較して Vav1 のリン酸化（活性化）が有意に亢進しており、インスリン抵抗性を誘導することが考えられている Tumor necrosis factor- α (TNF- α) や Interleukin-6 (IL-6), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) などのサイトカインの発現や分泌が亢進していた（図2）。このことは Cbl-b 欠損が T 細胞と同様に Vav1 のリン酸化を介してマクロファージを活性化することを示す。近年、Vav1 は Toll 様受容体における重要な調節分子であり、マクロファージにおける MCP-1 分泌の誘導因子であることが報告されている^{9,10)}。

A サイトカイン発現



B サイトカイン分泌



C Vav1リン酸化

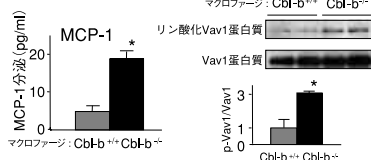


図2 Cbl-b^{-/-}マクロファージにおけるサイトカインの発現とマクロファージの活性化

(A-C)腹腔マクロファージはCbl-b^{+/+}、Cbl-b^{-/-}マウスの腹腔内にペプトンを投与し、3日後に腹腔より採取した。得られたマクロファージは3日間培養を行った。(A)mRNA量はReal-time RT-PCR法で、(B)メディウム中サイトカイン量はELISA法で、(C)タンパク質量はウェスタンブロット法を用いて解析した。平均値±SD (RT-PCR:n=4, ELISA:n=10, ウェスタンブロット:n=4)。*P<0.05¹⁹⁾

さらに、Vav1のリン酸化は転写因子であるNF-IL6の活性化を介してIL-6の発現を亢進し¹¹⁾、Vav1欠損はマクロファージの移行を減少させる¹²⁾。従って、Vav1はマクロファージの活性化に寄与することが考えられる。

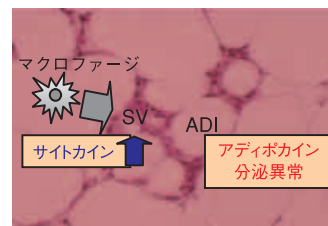
一方、横井らは自然発症I型糖尿病モデル動物であるKDPラットを用いてポジショナルクローニングを行い、Cbl-b遺伝子の変異(455番目アルギニンから終止コードへの変異)を同定した¹³⁾(図1)。彼らはCbl-bがラットのI型糖尿病の主要な原因遺伝子であると示した。Cbl-bの変異は重度の膵炎と低インスリン血症を引き起こした。本研究において、Cbl-b^{-/-}マウスのランゲルハンス島への免疫細胞の浸潤は認められなかったが、ランゲルハンス島近傍への単核細胞の浸潤が観察された(データは示さず)。これらの知見はCbl-b欠損が免疫細胞を活性化し、膵臓への浸潤を増大させることを示す。Cbl-bはプロリンリッチドメインを有することによりVav1のSH3ドメインと結合するので(図1)、KDPラットのC末端側欠損型Cbl-bはVav1との結合活性を失っているかもしれない。Cbl-b完全欠損よりもC末端側欠損型Cbl-bのほうがより重度の膵炎を引き起こす理由を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

脂肪組織における炎症性変化

過栄養により肥大した脂肪組織ではTNF-αやIL-6な

どの炎症性サイトカインの産生が亢進する¹⁴⁾。レプチンやアディポネクチンもまたインスリン抵抗性を制御するアディポカインである。肥満状態における高レプチン血症は肝臓や白色脂肪組織、骨格筋などでインスリン抵抗性を誘導し¹⁵⁾、アディポネクチンはインスリン感受性を増大させることが報告されている¹⁶⁾。このように脂肪組織における炎症性変化はインスリン抵抗性に大きく関与している。

脂肪組織は脂肪細胞からなる脂肪細胞画分 adipocyte fraction (AF) だけでなく内皮細胞、脂肪前駆細胞、白血球、マクロファージなどから成る非成熟脂肪細胞画分 stromal vascular fraction (SVF) が含まれている(図3A)。近年の研究により、肥満の脂肪組織にはマクロファージの浸潤が増加することが報告されており、このことが脂肪組織における炎症性変化を誘発すると考えられている^{1,2)}。白色脂肪組織に浸潤したマクロファージはTNF-α、IL-6のような炎症性サイトカインを産生し、脂肪細胞におけるインスリン抵抗性を引き起こす。本研究において、Cbl-b^{-/-}マウスは加齢に伴いII型糖尿病の主要な徴候である耐糖能異常、インスリン抵抗性を呈し、脂肪組織では、高度な肥満の脂肪組織で観察されるようなマクロファージの著明な浸潤像が観察された。これらの細胞はCD68陽性であったことからマクロファージであることが確認された(図3B)。さらに、この浸潤した

A 20週齢Cbl-b^{-/-}マウス脂肪組織

B 脂肪組織におけるマクロファージの浸潤

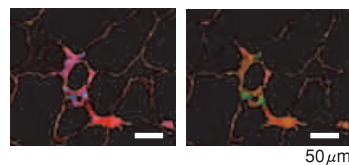


図3 Cbl-b^{-/-}マウスの脂肪組織におけるマクロファージの浸潤 (A)20週齢のCbl-b^{-/-}マウスの脂肪組織を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。ADIは脂肪細胞、SVは内皮細胞、脂肪前駆細胞、白血球、マクロファージなどからなる細胞群を示す。(B)20週齢のCbl-b^{-/-}マウスを用いて脂肪組織の免疫染色を行った。赤はLaminin(細胞膜)、緑はCD68(マクロファージ)、青はHoechst33342(核)を示す。

マクロファージは TNF- α や IL-6, MCP-1 などのサイトカインの発現が増大していた (データは示さず)。最近の研究において, Cbl-b^{-/-}マウスの骨髄由来肥満細胞は TNF- α や IL-6, MCP-1 産生を増大させることが報告されており¹⁷⁾, われわれの研究においても, Cbl-b 欠損がマクロファージにおける TNF- α , IL-6, MCP-1 の発現を亢進させることを示した。これらの知見は Cbl-b がマクロファージの機能と白色脂肪組織への浸潤, インスリン抵抗性を制御する重要な因子の 1 つであるということを示す。

MCP-1 と Cbl-b の関係

Cbl-b^{-/-}マウス由来マクロファージは TNF- α や IL-6, MCP-1 などのサイトカインの発現や分泌が亢進していた。その中でも, MCP-1 は単球走化性因子として同定された代表的な CC ケモカインであり, 単球や T 細胞の遊走活性, サイトカイン産生誘導, 接着分子の発現誘導などの機能を有する。肥満のマウスでは脂肪組織や血中の MCP-1 量が増加することが示されている。近年, MCP-1 遺伝子改変動物 (MCP-1 トランスジェニックマウスと MCP-1 ノックアウトマウス) を用いた研究により MCP-1 の役割が明らかになった¹⁸⁾。aP2 遺伝子プロモーターの制御の下で脂肪組織において MCP-1 導入遺伝子が発現するように操作されたマウス (脂肪組織特異的 MCP-1 トランスジェニックマウス) はインスリン抵抗性や脂肪組織へのマクロファージの浸潤を示した。さらに, MCP-1^{-/-}マウスは高脂肪食によって誘導されるインスリン抵抗性や脂肪組織におけるマクロファージの蓄積が減少する。これらの知見は脂肪組織での MCP-1 発現の増加がマウスでの肥満に関連するインスリン抵抗性や脂肪組織へのマクロファージの浸潤に寄与することを示す。われわれの結果においても, 20 週齢の Cbl-b^{-/-}マウスの血清 MCP-1 レベルは増大していた。この結果を基に Cbl-b^{-/-}マウスへの中和抗体投与を行った。抗 MCP-1 抗体投与群は non-immune IgG 投与群に比べインスリン抵抗性を改善し, 脂肪組織におけるマクロファージの浸潤を改善した (図 4)。これらの結果は増加した MCP-1 の分泌や活性化したマクロファージは脂肪組織における浸潤に寄与するかもしれないことを示す。したがって MCP-1 は Cbl-b^{-/-}マウスにおいて, マクロファージの炎症状態とインスリン抵抗性に関係する分子であることを示す。

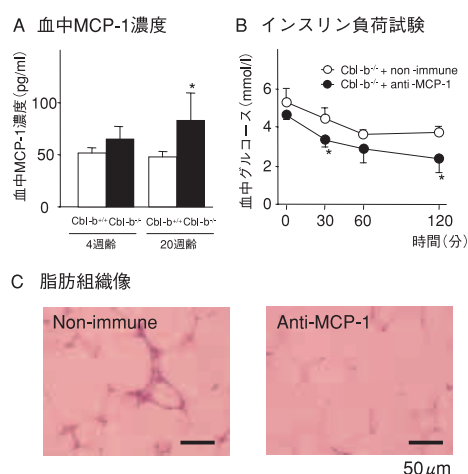


図4 Cbl-b^{-/-}マウスにおける抗 MCP-1 中和抗体の効果 (A) 血清中 MCP-1 量は ELISA 法により測定した。平均値 \pm SD (n=7)。*P<0.05 (B, C) Cbl-b^{-/-}マウスに 25 μ g の non-immune IgG あるいは MCP-1 中和抗体を 3 日おきに 2 週間腹腔内投与した。その後, インスリン負荷試験 (B), 脂肪組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色 (C) を行った。¹⁹⁾

おわりに

今回の研究により, Cbl-b を介したマクロファージの活性化がインスリン抵抗性の発症に重要な働きをしていることがわかった。われわれの知見は Cbl-b が II 型糖尿病の原因遺伝子の 1 つであり, 同疾患の治療に対する有用なターゲットとなり得ることを示す。

謝 辞

本総説において紹介した研究成果は, 次の方々との共同研究により遂行されました。諸先生方に深く感謝の意を表します。武田伸一先生 (国立精神・神経センター), 小畑利之先生, 蛭名洋介先生 (徳島大学酵素科学研究センター分子遺伝学部門), 石堂一巳先生 (徳島文理大学・健康科学研究所), 馬渡一論先生, 原田永勝先生, 保坂利男先生, 中屋豊先生 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部代謝栄養学分野)。

文 献

1. de Luca, C., Olefsky, J. M.: Stressed out about obesity and insulin resistance. Nat. Med., 12: 41-42, 2006
2. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., et al.: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in

- the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, **112** : 1821-1830, 2003
3. Bouloumie, A., Curat, C. A., Sengenès, C., Lolmede, K., *et al.* : Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **8** : 347-354, 2005
 4. Keane, M. M., Rivero-Lezcano, O. M., Mitchell, J. A., Robbins, K. C., *et al.* : Cloning and characterization of cbl-b : a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene. *Oncogene*, **10** : 2367-2377, 1995
 5. Liu, Y. C., Gu, H. : Cbl and Cbl-b in T-cell regulation. *Trends Immunol.*, **23** : 140-143, 2002
 6. Chiang, Y. J., Kole, H. K., Brown, K., Naramura, M., *et al.* : Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature*, **403** : 216-220, 2000
 7. Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y. Y., *et al.* : Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature*, **403** : 211-216, 2000
 8. Naramura, M., Jang, I. K., Kole, H., Huang, F., *et al.* : c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat. Immunol.*, **3** : 1192-1199, 2002
 9. Stovall, S. H., Yi, A. K., Meals, E. A., Talati, A. J., *et al.* : Role of vav1 and src-related tyrosine kinases in macrophage activation by CpG DNA. *J. Biol. Chem.*, **279** : 13809-13816, 2004
 10. Norata, G. D., Garlaschelli, K., Ongari, M., Raselli, S., *et al.* : Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J. Intern. Med.*, **258** : 21-27, 2005
 11. Godambe, S. A., Knapp, K. M., Meals, E. A., English, B. K. : Role of vav1 in the lipopolysaccharide-mediated upregulation of inducible nitric oxide synthase production and nuclear factor for interleukin-6 expression activity in murine macrophages. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **11** : 525-531, 2004
 12. Wells, C. M., Bhavsar, P. J., Evans, I. R., Vigorito, E., *et al.* : Vav1 and Vav2 play different roles in macrophage migration and cytoskeletal organization. *Exp. Cell. Res.*, **310** : 303-310, 2005
 13. Yokoi, N., Komeda, K., Wang, H. Y., Yano, H., *et al.* : Cblb is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. *Nat. Genet.*, **31** : 391-394, 2002
 14. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., *et al.* : Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, **112** : 1821-1830, 2003
 15. Ren, J. : Leptin and hyperleptinemia-from friend to foe for cardiovascular function. *J. Endocrinol.*, **181** : 1-10, 2004
 16. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., *et al.* : The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.*, **7** : 941-946, 2001
 17. Gustin, S. E., Thien, C. B., Langdon, W. Y. : Cbl-b is a negative regulator of inflammatory cytokines produced by IgE-activated mast cells. *J. Immunol.*, **177** : 5980-5989, 2006
 18. Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., *et al.* : MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.*, **116** : 1494-1505, 2006
 19. Hirasaka, K., Kohno, S., Goto, J., Furochi, H., *et al.* : Deficiency of cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and peripheral insulin resistance in mice. *Diabetes* (in press, 2007)

Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice

Katsuya Hirasaka, Shohei Kohno, Sachiko Kagawa, Reiko Nakao, Harumi Furochi, Kyoichi Kishi, and Takeshi Nikawa

Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

Obesity is a major cause of insulin resistance and is considered a chronic low-grade inflammatory disease. Substantial evidence has accumulated in recent years that chronic infiltration and activation of macrophages in white adipose tissue underlie the obesity-related component of these insulin resistant states. In the present study, we examined the role of Cbl-b, ubiquitin ligase, in insulin action. Elderly Cbl-b-deficient mice (Cbl-b^{-/-} mice) developed glucose intolerance and peripheral insulin resistance. Deficiency of Cbl-b gene was associated with infiltration of macrophages into the WAT and expression of cytokines, such as tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1. Furthermore, Vav1, a key factor in macrophage activation, was highly phosphorylated in peritoneal Cbl-b^{-/-} macrophages, compared with wild type macrophages, suggesting that Cbl-b deficiency induces macrophage activation. Our results suggest that Cbl-b is a negative regulator of macrophage activation, and that macrophage activation by Cbl-b deficiency, at least in part, contributes to the peripheral insulin resistance and glucose intolerance.

Key words : Cbl-b-deficient mice, macrophage, cytokine, white adipose tissue, insulin resistance