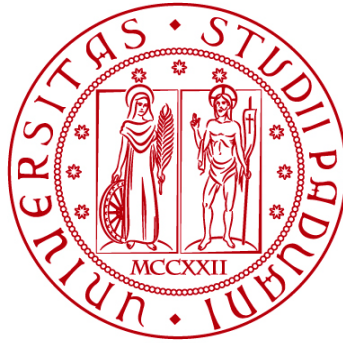


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**La mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 aggrava
l'infiammazione e l'insulino-resistenza indotte
dall'obesità nei topi maschi**

**Tutor: Prof.ssa Marina De Bernard
Dipartimento di Biologia**

Laureando: Alberto Arrighi

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	
1. STATO DELL'ARTE: <i>Introduzione alla problematica</i>	1
1.1 L'obesità.....	1
1.2 Insulino-resistenza ed infiammazione.....	2
1.3 Il segnale CX3CL1-CX3CR1.....	3
1.4 La polarizzazione dei macrofagi M1 ed M2.....	4
2. APPROCCIO SPERIMENTALE: <i>Materiali e metodi</i>	5
2.1 Modelli murini.....	5
2.2 Esperimenti sulle colture cellulari.....	5
2.3 Microarray <i>Affymetrix</i>	5
2.4 <i>Real-time</i> PCR.....	6
2.5 Saggio ELISA e quantificazione macromolecole.....	6
2.6 <i>Western Blot</i>	7
2.7 Analisi istologiche.....	7
2.8 Isolamento cellulare e citofluorimetria.....	7
2.9 <i>Glucose Tolerance Test</i> e <i>Insulin Tolerance Test</i>	8
2.10 Trapianto di midollo osseo.....	8
2.11 Effetti del trattamento con CX3CL1 in topi DIO.....	8
3. RISULTATI E DISCUSSIONE: <i>Analisi e discussione dell'approccio sperimentale</i>	9
3.1 L'espressione del gene <i>Cx3cl1</i> è sottoregolata nel tessuto adiposo dei topi obesi.....	9
3.2 La mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 aggrava l'infiammazione del tessuto adiposo, l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotte dalla dieta... 10	10
3.3 La mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 causa un aumento dei macrofagi M1 ed una diminuzione dei macrofagi M2 nel tessuto adiposo..... 11	11
3.4 Il trapianto di midollo osseo da mutanti <i>Cx3cr1^{-/-}</i> promuove disfunzioni metaboliche nei topi..... 12	12
3.5 La rimozione di CX3CR1 promuove l'infiammazione del tessuto adiposo e l'insulino-resistenza nei topi <i>ob/ob</i> 13	13
3.6 Il blocco del segnale CCL2-CCR2 nei mutanti <i>Cx3cr1^{-/-}</i> attenua l'insulino-resistenza indotta dall'obesità attraverso uno shift verso il profilo M2..... 14	14
3.7 CX3CL1 protegge dall'insulino-resistenza indotta dall'obesità..... 14	14
3.8 Discussione..... 15	15
BIBLIOGRAFIA	17
APPENDICE	17

ABSTRACT

L'obesità è una condizione patologica che induce uno stato di infiammazione cronica di basso grado a livello del tessuto adiposo; questa situazione viene generalmente favorita da un forte rilascio di citochine pro-infiammatorie e di chemochine. L'articolo si focalizza sull'analisi del ruolo della via di segnale CX3CL1-CX3CR1 nei fenomeni di insulino-resistenza ed infiammazione indotti dalla condizione di obesità e di come questi effetti vengano alterati in assenza del segnale. In particolar modo viene evidenziato come nei topi nutriti con una dieta HF (*high-fat*), pertanto in condizione DIO (*diet-induced obesity*), i livelli di espressione del gene *Cx3cl1* nel eWAT (*epididymal white adipose tissue*) siano fortemente diminuiti; inoltre, nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} la mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 induce un aggravamento delle condizioni di infiammazione, insulino-resistenza e steatosi epatica non alcolica. Risultati analoghi vengono ottenuti in topi *ob/ob* incrociati con topi *Cx3cr1*^{-/-} e nei topi WT trapiantati con midollo osseo proveniente dai mutanti *Cx3cr1*^{-/-}.

Infine, vengono analizzati i meccanismi di reclutamento e polarizzazione dei macrofagi M1/M2 indotti dal pathway di segnale della chemochina CX3CL1, l'aumento del numero di macrofagi antinfiammatori derivati dal blocco del segnale CCL2-CCR2 nonché le possibili applicazioni terapeutiche derivanti dallo studio del segnale CX3CL1-CX3CR1 in pazienti affetti da diabete di tipo II.

1. STATO DELL'ARTE: *Introduzione alla problematica*

1.1 L'obesità

L'obesità può essere definita come una patologia in cui l'accumulo di grasso corporeo è così eccessivo da poter influenzare negativamente lo stato di salute dell'individuo; tale condizione ha importanti ripercussioni a livello economico e, non da meno, a livello patologico ed è per questo che recentemente la AMA (*American Medical Association*) ha dichiarato l'obesità come una malattia in quanto tale [1][2]. Effettivamente stime relative ai paesi sviluppati hanno evidenziato come il costo dell'obesità in termini di denaro pubblico rivolto alle cure mediche si aggiri intorno ad un 2-7%. In genere l'obesità, ed in particolar modo il grasso corporeo, vengono descritti sulla base del BMI (*body mass index*) ovvero il rapporto tra il peso ed il quadrato dell'altezza di un individuo, espressa in metri. Di fatto l'utilizzo di un indice comune permette di analizzare e comparare in modo significativo individui o popolazioni tra loro diversi così da poter inferire dati relativi al rischio di sviluppo di una condizione di obesità. Si considera un soggetto obeso quando il suo BMI > 30 Kg/m² a prescindere dal sesso.

Dal punto di vista epidemiologico l'obesità si trova spazialmente diffusa in tutto il mondo anche se con frequenze dissimili nelle diverse popolazioni; in tal senso giocano un ruolo fondamentale l'economia e l'industrializzazione del paese considerato. È infatti possibile osservare che uno sviluppo socio-economico marcato induce un aumento nel numero degli individui sovrappeso fin dalla tenera età. In Europa i dati più consistenti provengono dallo studio *MONICA* risalente al periodo compreso tra gli anni 1983 e 1986 ed evidenziano come il 15% degli uomini ed il 22% delle donne fosse considerabile come obeso; in particolare più di metà della popolazione adulta tra i 35 ed i 65 anni era sovrappeso o obesa [1]. Al 2006, la WHO ha stimato che 1 miliardo di adulti nel mondo fossero sovrappeso e che 300 milioni fossero obesi [3]. In generale, il consistente aumento di individui obesi tra il 1980 ed il 1994 conferma come tale condizione possa emergere e fissarsi in pochissimi anni. È oltremodo visibile come l'obesità si stia espandendo anche in paesi dell'America latina o dei Caraibi, nonché in Giappone e Cina; inoltre, a causa della sua diffusione in comunità urbane e sottosviluppate è emerso come ad oggi essa sia ancor più frequente della malnutrizione.

Di fatto l'obesità non è un singolo disturbo ma può essere definita come un insieme di condizioni dovute a molteplici cause; infatti, come in parte descritto sopra, viene determinata dall'interazione tra fattori genetici, ambientali e psicosociali dovuti al processo tecnologico e dal loro effetto sull'assunzione e sulla spesa energetica.

L'obesità risulta avere molteplici effetti sulla salute e sulle funzioni fisiologiche dell'individuo; viene associata allo sviluppo di diabete mellito di tipo II, malattie coronariche (CHD), aumento dell'incidenza di forme tumorali, complicazioni respiratorie, osteoartrite nonché un aumento generalizzato del rischio di mortalità. Ovviamente l'influenza dell'obesità su patologie distinte deriva dalla distribuzione del tessuto adiposo in varie regioni [1].

1.2 Insulino-resistenza ed infiammazione

L'accumulo di tessuto adiposo a livello viscerale intraddominale è il fattore principale che induce ipertensione, diabete mellito di tipo II, iperlipidemia, elevate concentrazioni di insulina nel plasma ed insulino-resistenza [1].

L'insulina, in qualità di ormone, regola il metabolismo ma anche una serie di funzioni tipiche di cellule ed organi. Nel periodo post-prandiale l'insulina favorisce il riassorbimento del glucosio circolante introdotto con la dieta; vengono infatti stimolati l'utilizzo del glucosio da parte dei muscoli scheletrici o la glicogenosintesi a livello epatico. Alterazioni nel rilascio di insulina o nella sensibilità degli organi alla stessa possono indurre una serie di patologie metaboliche [2]. Effettivamente il diabete di tipo II è dovuto all'azione di ormoni, quali noradrenalina e cortisolo, che possono indurre la lipolisi a livello degli adipociti del tessuto adiposo addominale con conseguente rilascio di FFAs (*free fatty acids*) in circolo; questi hanno un effetto deleterio sull'uptake dell'insulina da parte del fegato, la quale induce quindi un aumento della gluconeogenesi epatica. Vengono dunque favorite iperinsulinemia sistemica ed insulino-resistenza nei muscoli scheletrici a causa di un'eccessiva secrezione di insulina da parte delle cellule β del pancreas [1].

Clinicamente l'insulino-resistenza è definita come una ridotta azione dell'insulina sul metabolismo del glucosio; questo rende possibile la presenza di individui insulino-resistenti la cui insulina presenta normale attività in altri processi biologici come il mantenimento della massa muscolare scheletrica. I dati riportano che la maggior parte degli individui insulino-resistenti sono obesi o sovrappeso il che rende l'obesità, e in particolar modo le disfunzioni metaboliche a livello dell'organo adiposo, i contribuenti principali in tale fenomeno. Anche lo stress ossidativo negli adipociti, l'infiammazione cronica nei tessuti non adiposi e lo stress del reticolo endoplasmatico sono di fatto regolatori del grado di sensibilità all'insulina; un eccesso di ROS comporta un aumento di stimoli pro-infiammatori (i.e. IL-6) con conseguente alterazione del ruolo di segnale dell'insulina. È inoltre necessario evidenziare come il tessuto adiposo non sia un organo inerte il cui unico scopo è di stoccare i lipidi; gli adipociti possono produrre adipochine o adipocitochine come la adiponectina la quale favorisce una maggior sensibilità all'insulina ed attiva la proteina AMPK (*AMP-activated protein kinase*) stimolando di fatto il metabolismo. Vengono secrete anche citochine pro-infiammatorie quali TNF- α e IL-6 la cui azione negativa sul metabolismo può essere locale o sistemica. È stato dimostrato che la secrezione alternativa di molecole diverse da parte degli adipociti è correlata alla condizione fisica del singolo individuo e pertanto può variare nel tempo. Infine, viene evidenziato come l'incapacità di stimolare la proliferazione degli adipociti conduca gli stessi ad ipertrofia. Gli effetti fondamentali di tale mancanza sono danneggiamento cellulare, apoptosi, piroptosi nonché un aumento dell'infiammazione locale e generalizzata dovuta al reclutamento ed attivazione dei macrofagi in senso M1. Sebbene la proliferazione, il numero e la grandezza degli adipociti *in vivo* siano ancora difficilmente identificabili, emerge come essi abbiano un ruolo essenziale nel definire l'insulino-resistenza nei pazienti obesi [2].

L'inflammation viene classicamente descritta come la principale risposta del corpo verso un danno e include 4 segni cardinali che sono gonfiore, rossore, calore e dolore; nel caso dell'obesità la definizione classica lascia il posto a quella di meta-inflammation (*metabolically triggered inflammation*). La meta-inflammation è definita come uno stato cronico a basso grado che comprende pathway simili al normale sebbene le cause scatenanti siano i nutrienti e il surplus metabolico. Durante l'evoluzione la capacità di processare e conservare l'energia si è fortemente intrecciata con la risposta immunitaria. Le unità funzionali che controllano le funzioni metaboliche e immunitarie sono evolute da un antenato comune; questo permette ai nutrienti di agire attraverso i sistemi di riconoscimento dei patogeni (i.e. TLRs) dando origine ad una risposta infiammatoria indotta da metaboliti o nutrienti. Inoltre, tessuto adiposo e fegato sono organizzati in modo tale che adipociti ed epatociti siano in stretto contatto con cellule di Kupffer o macrofagi. Di fatto meccanismi evoluti in un periodo in cui il surplus di nutrienti era molto sporadico e che bloccavano i pathway anabolici, sono ora fortemente dannosi. Obesità, insulino-resistenza e diabete di tipo II sono tra loro connessi da uno stato di infiammazione cronica; a livello del tessuto adiposo di modelli murini e umani vi è un forte rilascio di citochine pro-infiammatorie (i.e. TNF- α) e chemochine tra loro interagenti. L'assenza di queste molecole migliora il grado di sensibilità all'insulina e la omeostasi del glucosio nei topi [3].

1.3 Il segnale CX3CL1-CX3CR1

Le chemochine sono piccole molecole proteiche (ca. 8-10 kDa) la cui azione chemoattraente permette di reclutare una serie di leucociti (i.e. linfociti T e monociti) verso il sito di infiammazione e pertanto, insieme al proprio recettore, che consiste in 7 eliche transmembrana e che è accoppiato a proteina G, sono considerate target terapeutici nei processi di infiammazione cronica. Le chemochine possono essere classificate come infiammatorie o omeostatiche; inoltre, sulla base della disposizione spaziale delle prime 2 cisteine e sui ponti disolfuro costituiti, vengono suddivise in 4 sottofamiglie: C, CC, CXC e CX3C [4][6]. La famiglia CX3C è stata scoperta negli anni '90 e comprende un solo membro detto CX3CL1 o fractalchina; questa è composta da 373 aa distribuiti in un dominio N-terminale extracellulare, uno stelo di mucine, un α -elica transmembrana e un dominio citoplasmatico relativamente corto. La forma solubile, indotta dal taglio proteolitico da parte di metalloproteasi quali ADAM-10 e ADAM-17/TACE che vengono stimulate dalla presenza di LPS o IL-1 β , comprende esclusivamente il dominio mucinico ed extracellulare ed ha funzione chemoattraente verso monociti, cellule NK e linfociti T; la forma ancorata alla membrana delle cellule endoteliali viene indotta dalla presenza di citochine pro-infiammatorie quali TNF- α , IFN- γ e IL-1 e permette l'adesione dei leucociti in modo integrina-indipendente. In effetti la presenza di CX3CL1 altera il processo classico di adesione nel fenomeno di migrazione attiva; il dominio N-terminale si lega a CX3CR1 tramite i propri residui aminoacidi carichi positivamente (i.e. Lys-

7 e Arg-47) e svolge il suo ruolo di molecole di adesione rendendo gli altri legami ininfluenti [4][5][6]. CX3CL1 viene inoltre espressa nei monociti durante i processi infiammatori ma anche nei macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule dendritiche. Il recettore CX3CR1 si ritrova sulla superficie di linfociti effettori quali cellule NK, cellule T citotossiche e cellule $\gamma\delta$ [4]; inoltre, l'espressione a livello dei monociti circolanti ci permette di distinguerli in 2 grandi gruppi nei topi: CX3CR1^{low} (Ly6C^{hi}) precursori dei macrofagi pro-infiammatori e CX3CR1^{hi} (Ly6C^{low}) precursori dei macrofagi antinfiammatori [5].

Il segnale CX3CL1-CX3CR1 gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi e progressione di diverse malattie; l'aumento della via di segnale promuove l'infiammazione nell'aterosclerosi, nelle malattie cardiovascolari e nella artrite reumatoide attraverso la regolazione dei macrofagi e dei linfociti T. Diversamente, l'aumento di tale via può avere effetti preventivi sull'infiammazione intestinale e sulle coliti, sulle disfunzioni delle cellule β del pancreas e sull'obesità indotta dalla dieta; inoltre, il segnale può favorire una polarizzazione in senso M2 dei macrofagi a livello di tumore della pelle. In aggiunta CX3CL1 blocca il sito di legame di CX3CR1 che fungerebbe da co-recettore durante l'infezione da HIV, entra in gioco in patologie quali vasculiti, neuropatie, degenerazione maculare senile nonché tumori, ove esercita un ruolo pro ed anti-tumorale. Infine, il segnale ha un ruolo importante nell'adesione dei monociti agli adipociti, nella produzione locale di citochine e nei conseguenti processi di infiammazione ed insulino-resistenza sebbene esperimenti differenti abbiano dedotto informazioni discordanti [5][6].

1.4 La polarizzazione dei macrofagi M1 ed M2

I macrofagi sono una piccola popolazione di leucociti scoperta alla fine del 19esimo secolo e fanno parte del sistema dell'immunità innata tipico di ogni organismo; originano generalmente dai monociti circolanti rilasciati dal midollo osseo sebbene possano essere rinvenuti macrofagi residenti in determinati tessuti i quali sono stati prodotti precedentemente alla nascita a partire dal sacco vitellino. Le loro funzioni spaziano dalla fagocitosi dei patogeni alla presentazione antigenica in MHC-II, fino alla produzione di una serie di citochine (i.e. IL-1, IL-6, TNF- α). Si possono identificare 2 grandi tipologie di macrofagi: pro-infiammatori o classicamente attivati (M1) ed antinfiammatori o alternativamente attivati (M2); la polarizzazione verso uno dei due tipi avviene sulla base del milieu citochinico e pertanto i macrofagi sono capaci di switchare tra i 2 fenotipi sulla base di diversi stimoli micro-ambientali. Il profilo M1 viene indotto dall'interazione con LPS batterico o dalla presenza di citochine, quali INF- γ e TNF- α , prodotte dai linfociti Th1 mentre il profilo M2 viene favorito dalla presenza di IL-4 e IL-13, che sono prodotte dai linfociti Th2 e che possono attivare STAT6 tramite il recettore IL-4R α . Di conseguenza il profilo M1 produce alti livelli di citochine pro-infiammatorie come TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23 nonché iNOS, ove IL-6, IL-1 β e TNF- α inducono insulino-resistenza bloccando l'azione di leptina e adiponectina; di contro, il profilo M2 produce citochine antinfiammatorie come IL-10 e TGF- β [7].

2. APPROCCIO SPERIMENTALE: *Materiali e metodi*

2.1 Modelli murini

I topi utilizzati nell'articolo appartengono tutti al ceppo C57BL/6J; i WT sono stati comprati dai laboratori Charles River mentre i mutanti *Cx3cr1*^{-/-} e *Ccl2*^{-/-} (presentanti la delezione in omozigosi) sono stati forniti dal Professor N. Mukaida. Gli esperimenti hanno interessato anche topi *ob/ob*, deficitari del gene codificante la leptina, e mutanti *Cx3cr1/ob* prodotti dall'incrocio tra le 2 linee. I topi WT e mutanti *Cx3cr1*^{-/-} sono stati nutriti alternativamente con pasti normali (NC, *normal chow*), in cui il 10% di calorie provenivano dai grassi, o con una dieta ad alto contenuto di grassi (HF, *high-fat*), in cui il 60% delle calorie provenivano dai grassi; i topi *Cx3cr1*^{-/-} sono stati quindi comparati coi loro fratelli WT. Inoltre, tutti gli individui sono stati mantenuti in un ciclo luce/buio di 12 ore ed hanno avuto libero accesso a cibo ed acqua.

2.2 Esperimenti sulle colture cellulari

Per l'analisi dei macrofagi peritoneali sono stati utilizzati topi WT e mutanti *Cx3cr1*^{-/-} a 8 settimane di vita. A distanza di 48 ore dall'iniezione negli stessi di 4% (p/v) di tioglicolato, i macrofagi peritoneali sono stati isolati e coltivati in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), un terreno ampiamente utilizzato per favorire la crescita di un'ampia varietà di cellule di mammifero, a cui è stato aggiunto un 10% (v/v) di siero fetale bovino che funge da supplemento per la crescita delle cellule eucariotiche in terreno basale. Quindi, dopo 6 ore di inedia, le cellule sono state incubate su piastre a 6 pozzetti con concentrazioni crescenti di lipopolisaccaride (LPS) o, in alternativa, di interleuchina 4 (IL-4) per un periodo di 16 ore a 37°C e 5% (v/v) di CO₂.

2.3 Microarray *Affymetrix*

I microarray *Affymetrix* sono una tecnica nata a partire dal *Northern Blot* che prevede di sintetizzare *in situ*, su supporti in silice o su vetrini da microscopia, delle sonde specifiche (generalmente oligonucleotidi) per un dato trascritto marcato a cui si possono ibridare; la loro sintesi avviene tramite l'utilizzo di maschere fotolitografiche e fosforamiditi fotoattivabili il che li rende molto costosi ma altamente riproducibili. Di fatto i microarray sono definiti come matrici ordinate di molecole di acidi nucleici che sono dette sonde (o probes) e che sono legate al substrato in posizioni specifiche il che mi permette di definire dove si trovava l'oligonucleotide e a che trascritto era complementare così da poter risalire al gene di riferimento; i trascritti da analizzare sono definiti target e generalmente sono marcati con una sostanza fluorescente in modo diretto od indiretto. Gli *Affymetrix* sono a singolo canale dal momento che viene ad essere marcato un singolo campione; di fatto questa tecnica permette di operare *expression detection* così da definire la quantità assoluta o relativa di trascritto e di conseguenza il grado di espressione di un determinato gene. La rilevazione della fluorescenza avviene

attraverso uno scanner dotato di laser che eccita il fluoroforo e scansiona il chip creando un'immagine TIF 16 BIT.

2.4 Real-time PCR

La *real-time* PCR, anche detta PCR quantitativa, permette di misurare in maniera quantitativa l'abbondanza assoluta o relativa del prodotto di PCR tra 2 campioni; in particolar modo questa tecnica consente di analizzare ciclo per ciclo la quantità di amplicone prodotto cosicché, comparando la quantità di fluorescenza generata dalla molecola intercalante ed il numero di cicli, si possano descrivere una serie di curve con andamento sigmoidale. Viene quindi definito il ciclo soglia (C_t) ovvero il ciclo a cui la fluorescenza prodotta diventa rilevabile e, sapendo che questo corrisponde all'entrata in fase esponenziale, vi sarà corrispondenza tra quantità di template, amplicone prodotto e ciclo di riferimento. Maggiore è la quantità di template iniziale e più facilmente verrà raggiunto il ciclo soglia; questo ci permette di descrivere la concentrazione iniziale di campione sulla base del ciclo soglia stesso. Per definire la differenza di espressione di un gene tra 2 campioni può essere applicato il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ che si basa su un gene *housekeeping* utile alla normalizzazione. L'RNA totale è stato estratto a partire da tessuto adiposo congelato, nonché da altri tessuti, ed è stato successivamente retroscritto a cDNA così da poterlo amplificare in *real-time* PCR; sono stati utilizzati più primer per permettere un'analisi esplorativa su geni differenti e per ognuno di questi è stata ottenuta una curva standard da cui sono stati estrapolati il C_t e, dunque, la quantità di template iniziale. L'intercalante aggiunto è il SYBR *Green* mentre il gene *housekeeping* utilizzato per normalizzare è l'rRNA 18S dal momento la sua espressione rimane costante in tessuti o condizioni differenti.

2.5 Saggio ELISA e quantificazione macromolecole

I campioni di sangue sono stati ottenuti dalla vena caudale di animali posti a digiuno per 12 ore e sono stati centrifugati per ottenere il plasma, il quale è stato a sua volta congelato a -70°C per poterlo analizzare. I livelli plasmatici di colesterolo totale, acidi grassi non esterificati (NEFA) e trigliceridi sono stati analizzati attraverso un metodo colorimetrico utilizzando kit prodotti dalle *Wako Pure Chemical Industries*; i livelli epatici di trigliceridi sono stati analizzati con un kit analogo, a partire dall'estrazione dei lipidi epatici con cloroformio/metanolo (2:1).

I livelli plasmatici di fractalchina e TNF- α sono stati misurati tramite saggio ELISA; questa metodica permette di determinare la presenza e la concentrazione, anche minima, di peptidi e proteine nei fluidi biologici tramite l'utilizzo di enzimi coniugati ad anticorpi e pertanto viene anche definita saggio immunoenzimatico. L'antigene di interesse viene bloccato su fase solida e può essere riconosciuto dall'Ab legato a glucosio ossidasi, perossidasi, fosfatasi alcalina. Le reazioni catalizzate dagli enzimi vengono dunque bloccate utilizzando NaOH, HCl o H₂SO₄ e l'analisi finale viene operata con uno spettrofotometro a lunghezze d'onda di 400-600 nm sulla base dell'enzima considerato [8].

2.6 Western Blot

Il *Western Blot* è una tecnica semiquantitativa che permette di trasferire le proteine da un gel in cui è avvenuta la corsa elettroforetica ad una membrana di nitrocellulosa o PVDF mantenendone la separazione; tale metodica permette di visualizzare differenze tra 2 o più campioni all'interno della medesima membrana dal momento che è possibile identificare la proteina di interesse e quantificarne la concentrazione. La rilevazione della proteina può essere operata attraverso l'utilizzo esclusivo di anticorpi primari o con l'aggiunta di anticorpi secondari; di fatto è possibile operare marcature dirette (sui primari) o indirette (sui secondari) tra cui l'utilizzo di perossidasi, fosfatasi alcaline o fluorofori. In questo caso i tessuti sono stati omogeneizzati e sonicati in RIPA buffer, a cui sono stati aggiunti inibitori delle proteasi e PhosStop (inibitore delle fosfatasi); quindi, le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE e trasferite su una membrana di PVDF ove sono state incubate con gli Ab legati a perossidasi.

2.7 Analisi istologiche

Le analisi delle sezioni di tessuto adiposo epididimale, fegato e pancreas fissate in paraffina sono state condotte attraverso una colorazione classica ematossilina-eosina (E&E); inoltre, sono state analizzate in immunistoichimica con Ab diretti verso una serie di marker tra cui F4/80, molecola caratterizzante i macrofagi murini, e Ki67, marker di proliferazione cellulare, nonché con il DAPI per evidenziare i nuclei cellulari. Di fatto l'immunistoichimica è una tecnica che si applica a sezioni di tessuto (diversamente l'immunocitochimica è rivolta a cellule in coltura) e che permette di visualizzare una proteina tramite l'utilizzo di un Ab (primario e eventualmente secondario) che riconosce un antigene presente nel tessuto; la marcatura dell'anticorpo può essere di tipo diretto od indiretto e prevede di utilizzare molecole fluorescenti (immunofluorescenza) o enzimi che rilasciano un precipitato cromogeno in presenza dell'opportuno substrato. Nel caso del tessuto adiposo epididimale si è prima perfuso il topo con 1% di paraformaldeide per poi porre il tessuto estratto in incubazione con Ab primari a 4°C overnight; si è quindi incubato il medesimo con Ab secondari legati a fluorofori, analizzandolo con un microscopio confocale invertito.

2.8 Isolamento cellulare e citofluorimetria

Gli adipociti e le cellule della frazione stromale vascolare (SVF, contiene cellule staminali, pre-adipociti, cellule endoteliali, periciti, linfociti T e macrofagi M2) sono stati separati a partire dal prelievo di cuscinetti di grasso epididimale da topi maschi del ceppo C57BL/6J nutriti con una dieta NC o HF; il tessuto è stato tritato con l'utilizzo di forbici e digerito con collagenasi di tipo II per 20 minuti a 37°C in PBS contenente 2% di BSA. La collagenasi II, in qualità di proteasi, taglia il legame tra un amminoacido neutro (X) e la glicina in una sequenza tipo Pro-X-Gly-Pro solitamente rinvenuta nel collagene. Le cellule in sospensione sono quindi state filtrate (filtro 100 µm) e centrifugate a 300 x g per 5 minuti.

Le cellule della SVF sono state risospese in PBS con 2% di BSA (pH 7.4) e incubate con Ab coniugati ad un fluoroforo; la citofluorimetria è una metodica che analizza singole cellule o particelle che, immerse in un buffer salino, fluiscono attraverso dei laser. Viene di fatto misurata la dispersione luminosa indotta a seguito dell'eccitamento del fluoroforo e questo avviene su 2 direzioni: *forward scatter* (analizza dimensione) e *side scatter* (analizza la complessità interna) [9].

2.9 Glucose Tolerance Test e Insulin Tolerance Test

Il GTT e l'ITT sono due test applicati per verificare la salute metabolica dell'individuo. Il GTT è stato condotto dopo un digiuno overnight, a cui è seguita l'iniezione intraperitoneale di glucosio (2g per kg di peso corporeo); campioni di sangue sono stati prelevati a tempi crescenti al fine di determinare i livelli ematici di glucosio e insulina. L'ITT è stato applicato a seguito di un digiuno di 4 ore tramite l'iniezione di insulina umana a livello intraperitoneale (0.75 U/kg per i topi HF-DIO e 1.5 U/kg per i *Cx3cr1/ob* e *ob/ob*). Tutti i campioni sono stati prelevati tramite il taglio della porzione terminale della coda dell'individuo; inoltre, i livelli ematici di glucosio sono stati misurati tramite delle *strips* o saggio ELISA.

2.10 Trapianto di midollo osseo

Le cellule del midollo osseo sono state prelevate da femori e tibie di topi C57BL/6J (WT) e mutanti *Cx3cr1^{-/-}* a 8 settimane di vita e sono state trapiantate attraverso la vena della coda in topi precedentemente irradiati con 10 Gy di radiazioni (i.e. raggi X o raggi γ) i quali avevano dunque perso la capacità di condurre emopoiesi. Sono stati quindi generati una serie di topi chimerici, i quali hanno dovuto riprendersi per 4 settimane per poter ricostituire il sistema ematopoietico. Conseguentemente, il DNA genomico è stato estratto a partire dal sangue periferico, i topi sono stati nutriti con una dieta NC o HF per 8 settimane e sono stati sottoposti al GTT mentre i tessuti sono stati estratti solamente dopo 10 settimane di alimentazione con una specifica dieta.

2.11 Effetti del trattamento con CX3CL1 in topi DIO

Il cDNA *full-length* di CX3CL1 è stato ottenuto tramite RT-PCR a partire dal tessuto epatico dei topi ed è stato successivamente clonato in un vettore plasmidico pLIVE che permette di avere un alto e prolungato livello di espressione del transgene nel fegato murino; inoltre, il vettore possiede 2 introni utili ad aumentare l'espressione del gene esogeno, un sito di policlonaggio (MCS) con 8 siti di restrizione univoci utili all'inserimento del transgene ed infine un promotore chimerico costituito dall'enhancer di tipo II dell' α -fetoproteina (marker del tumore al fegato, ovaie o testicoli) e dal promotore minimale dell'albumina, entrambi provenienti dal topo. Dopo aver nutrito per 6 settimane con una dieta HF i topi C57BL/6J (WT) e mutanti *Cx3cr1^{-/-}*, il vettore pLIVE-CX3CL1 ed il vettore assente di transgene (controllo) sono stati inoculati in dose di 10 μ g/topo attraverso un'iniezione idrodinamica nella vena caudale.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE: *Analisi e discussione dell'approccio sperimentale*

3.1 L'espressione del gene *Cx3cl1* è sottoregolata nel tessuto adiposo dei topi obesi

Sono stati inizialmente comparati i livelli di espressione genica di una serie di chemochine e dei loro recettori nel tessuto adiposo epididimale di topi WT nutriti con una dieta HF o NC utilizzando la tecnica dei microarray *Affymetrix*; è dunque emerso che l'espressione di *Cx3cl1* è estremamente diminuita in eWAT dei soggetti DIO mentre, contrariamente, i geni *Ccl2*, *Ccr2*, *Ccl5* e *Ccr5* sono maggiormente espressi durante lo sviluppo dell'obesità. Ulteriori analisi tramite *real-time* PCR hanno evidenziato che la concentrazione di mRNA di *Cx3cl1* è consistentemente inferiore unicamente in eWAT dei topi DIO (Fig.1A). Analogamente è risultato che i livelli di mRNA di *Ccl2* e *Ccr2* sono incrementati in eWAT tra le 8 e 20 settimane dall'inizio della dieta HF o nei topi *ob/ob* mentre i livelli di mRNA di *Cx3cl1* seguono un processo di diminuzione costante durante l'alimentazione HF così come nei topi *ob/ob* a 8 settimane di vita; diversamente i livelli di mRNA di *Cx3cr1* non mostrano evidenti variazioni (Fig.1B e 1C). Inoltre, la concentrazione plasmatica di CX3CL1 è diminuita notevolmente nei topi DIO rispetto a quelli magri (Fig.1D). Si è quindi utilizzata la *real-time* PCR per determinare i livelli di espressione di *Cx3cl1* e *Cx3cr1* negli adipociti e nei macrofagi contenuti nella SVF in eWAT dei topi DIO o magri; di fatto l'espressione è maggiore nei macrofagi F4/80⁺ rispetto agli adipociti perilipina⁺ in entrambe le condizioni e questo è stato confermato anche tramite analisi in *immunostaining* che hanno evidenziato come l'espressione sia caratteristica dei macrofagi M1 CD11c⁺/CD206⁻ e di quelli M2 CD11c⁻/CD206⁺ (Fig.1E e 1F).

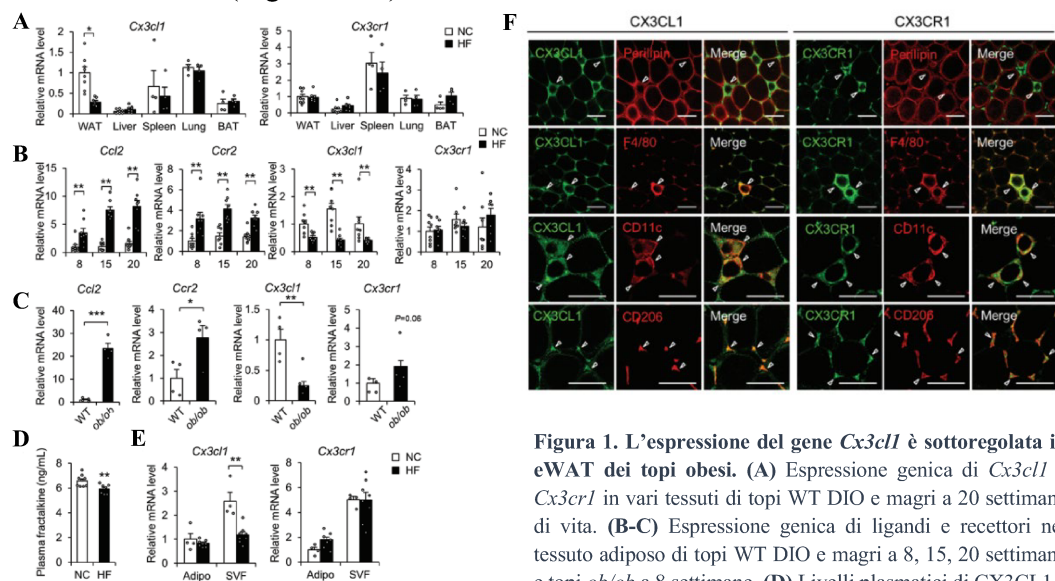


Figura 1. L'espressione del gene *Cx3cl1* è sottoregolata in eWAT dei topi obesi. (A) Espressione genica di *Cx3cl1* e *Cx3cr1* in vari tessuti di topi WT DIO e magri a 20 settimane di vita. (B-C) Espressione genica di ligandi e recettori nel tessuto adiposo di topi WT DIO e magri a 8, 15, 20 settimane e topi *ob/ob* a 8 settimane. (D) Livelli plasmatici di CX3CL1 a

16 settimane. (E) Espressione di *Cx3cl1* e *Cx3cr1* negli adipociti e nei macrofagi della SVF del tessuto adiposo epididimale in topo. (F) Analisi immunocitochimica del tessuto adiposo epididimale in topi DIO con Ab anti-CX3CL1 (verde), anti-CX3CR1 (verde), anti-F4/80 (rosso), anti-perilipina (rosso), anti-CD11c (rosso), anti-CD206 (rosso). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

3.2 La mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 aggrava l'infiammazione del tessuto adiposo, l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotte dalla dieta

Per determinare il ruolo che il segnale CX3CL1-CX3CR1 ha *in vivo* sui fenomeni indotti dalla dieta si è analizzato il fenotipo metabolico nei topi WT e mutanti *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con una dieta HF o NC per 16 settimane. L'aumento di peso corporeo negli individui WT e in quelli *Cx3cr1*^{-/-} nelle condizioni considerate è simile, così come non risulta significativo l'incremento nel peso del tessuto adiposo e del fegato e nei livelli plasmatici di glucosio a digiuno; diversamente, si registra un incremento dei livelli plasmatici di trigliceridi, colesterolo totale e NEFA nei topi *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con entrambe le diete. Inoltre, vi è un marcato accumulo epatico di trigliceridi nei topi *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con la dieta HF. Il GTT ha quindi evidenziato come i mutanti *Cx3cr1*^{-/-} siano caratterizzati da una tolleranza al glucosio compromessa rispetto ai WT con entrambe le diete (Fig.2A); in aggiunta, si è dimostrato che l'iperinsulinemia indotta dalla dieta HF viene fortemente aggravata nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} (Fig.2B). Analogamente, topi *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con la dieta HF mostrano un incremento nelle infiltrazioni di macrofagi F4/80⁺ a livello di tessuto adiposo, i quali si associano a formare delle strutture a corona circondanti gli adipociti (Fig.2C e 2D); questo sebbene le dimensioni degli adipociti siano inalterate. Nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} i livelli di espressione genica della leptina sono aumentati mentre nel caso dell'adiponectina rimangono inalterati (Fig.2E); si è poi osservato un aumento della fosforilazione della subunità p65 di NF-κB nei topi *Cx3cr1*^{-/-} DIO ed una diminuzione della fosforilazione di IRβ e Akt indotte dall'insulina in fegato ed eWAT dei *Cx3cr1*^{-/-} (Fig.2F). Inoltre, nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} l'espressione genica di marker dei macrofagi M1, tra cui i geni *Itgax* e *Tnf*, è fortemente aumentata mentre l'espressione di marker dei macrofagi M2, come il gene *Mrc1*, è inalterata rispetto ai WT in entrambe le diete (Fig.2E). Infine, aumenta la concentrazione plasmatica di TNF-α nei topi *Cx3cr1*^{-/-} DIO (Fig.2G).

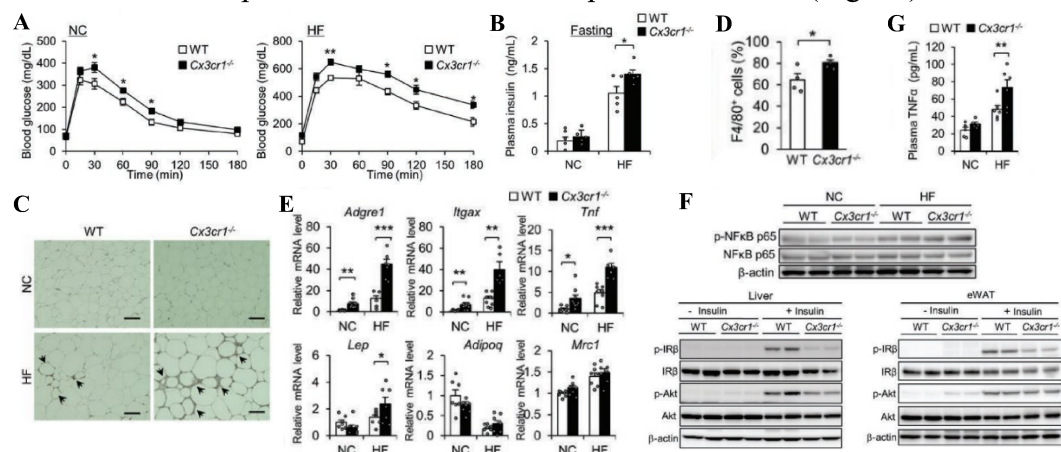


Figura 2. La mancanza di CX3CR1 promuove l'infiammazione del tessuto adiposo, l'insulino-resistenza e la steatosi epatica indotte dalla dieta. (A) Livelli ematici di glucosio in topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nelle due diete. (B) Livelli plasmatici di insulina a digiuno. (C) Infiltrazione di macrofagi in eWAT di topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con dieta NC o HF a 20 settimane, analisi in *immunostaining* con Ab anti-F4/80. (D) Rapporto tra cellule F4/80⁺ e numero totale di cellule in eWAT di topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nutriti HF. (E) Espressione genica di geni codificanti marker dei macrofagi ed ormoni in eWAT di topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} di 20 settimane. (F) Analisi tramite *Western Blot* di p-NF-κB p65 e delle proteine totali in eWAT dei topi. (G) Livelli plasmatici di TNF-α in topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con dieta NC e HF. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Per determinare gli effetti dovuti alla mancanza di CX3CR1 sulle cellule β del pancreas secernenti insulina si è misurata la dimensione degli isolotti in cui tali cellule erano contenute attraverso un'analisi morfometrica basata sull'*immunostaining*; è stato rilevato che la dimensione degli isolotti aumentava nei topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con la dieta HF mentre non vi era una differenza significativa tra i due soggetti nutriti con la medesima dieta limitatamente alla proliferazione e dimensione delle cellule β (Fig.3A e 3B). Inoltre, la dimensione stessa delle cellule α secernenti glucagone è inalterata nei topi *Cx3cr1*^{-/-}.

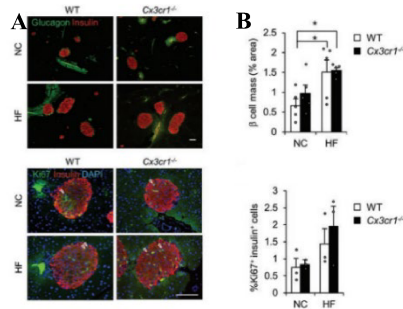


Figura 3. Massa e proliferazione delle cellule β in topi *Cx3cr1*^{-/-}. (A) Analisi immunocitochimica degli isolotti in topi nutriti NC e HF tramite Ab anti-insulina (rosso), anti-glucagone (verde), anti-Ki67 (verde) e DAPI (blu). (B) Massa delle cellule β e % delle cellule insulina⁺Ki67⁺ nei topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con dieta NC e HF. **p*<0,05

3.3 La mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 causa un aumento dei macrofagi M1 ed una diminuzione dei macrofagi M2 nel tessuto adiposo

Come dimostrato in *immunostaining*, l'infiltrazione dei macrofagi M1 a livello del tessuto adiposo è incrementata nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} in entrambe le diete mentre, come già evidenziato, CX3CL1 e CX3CR1 si ritrovano in maniera ubiquitaria sui macrofagi M1 e M2 del tessuto adiposo nei topi DIO. Per determinare il sottotipo di macrofagi del tessuto adiposo è stata utilizzata la citofluorimetria; rispetto ai WT, nei topi *Cx3cr1*^{-/-} nutriti NC vi era un incremento del 40.3% dei macrofagi M1 ed una diminuzione del 17% degli M2 mentre nei nutriti con la dieta HF gli M1 aumentavano di un 39% e gli M2 diminuivano di un 49% il che suggerisce una predominanza del fenotipo M1 su quello M2. (Fig.4A-4B). D'altro canto, il numero totale di macrofagi nel tessuto adiposo non cambia tra i differenti genotipi nella medesima dieta (Fig.4B). Inoltre, si osserva una prevalenza della popolazione di monociti Ly6C^{hi} (futuri macrofagi M1) a livello del sangue periferico e nelle cellule del midollo osseo dei topi mutanti *Cx3cr1*^{-/-} (Fig.4C e 4D).

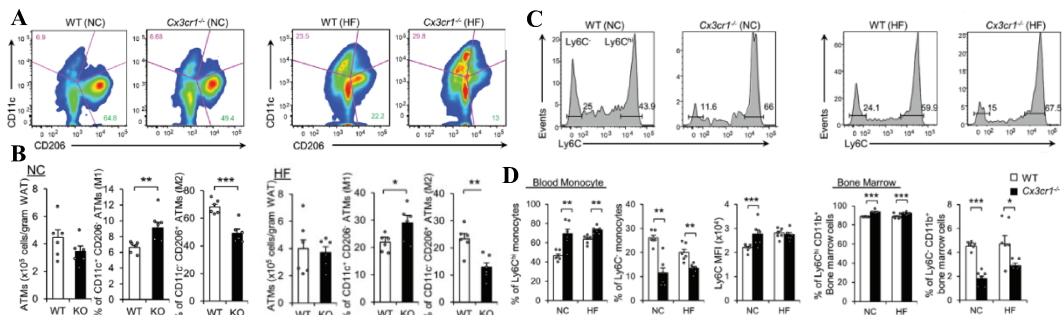


Figura 4. Aumento dei macrofagi M1 e diminuzione dei macrofagi M2 in eWAT dei topi *Cx3cr1*^{-/-}. (A) Analisi dei macrofagi M1 CD11c⁺/CD206⁺ e M2 CD11c⁺/CD206⁺ nel tessuto adiposo di topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con dieta NC e HF. (B) Quantificazione dei macrofagi totali e dei profili M1/M2 in eWAT in topi nutriti con dieta NC o HF. (C) Analisi del sottotipo di monociti ematici (Ly6C^{hi}/Ly6C^{low}) in topi nutriti con dieta NC o HF. (D) Analisi quantitative della percentuale di monociti Ly6C^{hi} e Ly6C⁺ in sangue e midollo osseo di topi nutriti con dieta NC e HF. **p*<0,05 ***p*<0,01 ****p*<0,001

La mancanza di *Cx3cr1* nei macrofagi peritoneali aumenta i livelli di espressione genica di marker dei macrofagi M1 indotti dalla presenza di LPS come *Tnf* e *Il1b*, mentre diminuisce i livelli di espressione genica dei marker degli M2 indotti da IL-4 come *Mrc1* e *Il10* (Fig.5A). CX3CL1 singolarmente non ha effetti sulla espressione dei marker, ma la sua esposizione verso i macrofagi peritoneali diminuisce l'espressione dei marker degli M1 in maniera dose-dipendente ed aumenta l'espressione dei marker degli M2 (Fig.5B).

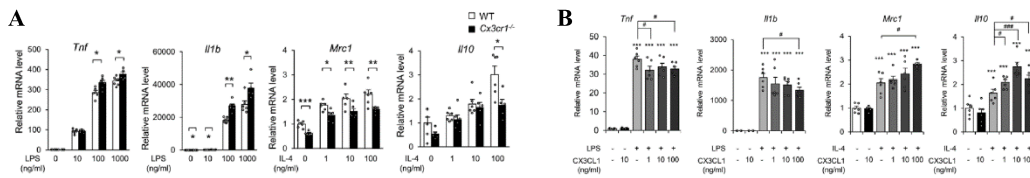


Figura 5. Il segnale CX3CL1-CX3CR1 sopprime l'attivazione dei macrofagi M1 indotti dalla presenza di LPS ed aumenta l'espressione dei marker dei macrofagi M2 indotti dalla presenza di IL-4. (A) Espressione di marker dei macrofagi e citochine nei macrofagi peritoneali di topi WT e mutanti *Cx3cr1*^{-/-}. (B) Espressione di marker dei macrofagi e citochine nei macrofagi peritoneali isolati dal tessuto adiposo ed incubati con 10 ng/mL di LPS o di IL-4 e 1-100ng/mL di CX3CL1 per 16 ore. **p*<0,05 ***p*<0,01 ****p*<0,001 #*p*<0,5 ##*p*<0,01 ###*p*<0,001

3.4 Il trapianto di midollo osseo da mutanti *Cx3cr1*^{-/-} promuove disfunzioni metaboliche nei topi

Per studiare gli effetti della mancanza di CX3CR1 nei macrofagi derivati dal midollo osseo si sono prodotti, attraverso il trapianto di midollo osseo tra individui di pari età, dei topi chimerici specificatamente a livello delle cellule mieloidi, come spiegato precedentemente. Per definire le cellule *Cx3cr1*^{-/-} presenti nel sangue di topi chimerici, derivanti dal trapianto di cellule del midollo osseo da mutanti *Cx3cr1*^{-/-} a WT, si è utilizzata una PCR verso il DNA genomico a partire dal sangue intero, utilizzando primer specifici per il gene *neo* mutante per delezione nel vettore di targeting per *Cx3cr1*; l'amplicone è visibile solo nei topi chimerici prodotti come *Cx3cr1*^{-/-} to WT e non nei WT to WT. Per determinare il ruolo che il segnale CX3CL1-CX3CR1, presente sui macrofagi derivanti dal midollo osseo, ha sul metabolismo del glucosio si sono prodotti topi chimerici a partire dal trapianto di cellule del midollo osseo da topi WT e mutanti *Cx3cr1*^{-/-} in individui WT, i quali sono stati poi nutriti HF per 12 settimane; in entrambi i casi si osserva un discreto aumento di peso ed una moderata condizione DIO. I soggetti WT trapiantati a partire da mutanti *Cx3cr1*^{-/-} vedono l'aggravarsi delle condizioni di steatosi epatica, di alterata tolleranza al glucosio e di ridotta segnalazione da parte dell'insulina indotte dalla dieta HF mentre non si hanno effetti sulla infiltrazione dei macrofagi (Fig.6A, 6B, 6C, 6D); ciò evidenzia come sia sufficiente il trapianto di cellule ematopoietiche da mutanti *Cx3cr1*^{-/-} per promuovere alterazioni del metabolismo del glucosio indotte dalla dieta. Inoltre, la mancanza di CX3CR1 nelle cellule mieloidi comporta un aumento del 30% dei macrofagi M1 ed una diminuzione del 16% degli M2 rispetto ai WT e pertanto si osserva una dominanza degli M1 nel tessuto adiposo (Fig.6E e 6F). Quindi, si è analizzato il ripristino del segnale attraverso il trapianto a partire da topi *Cx3cr1*^{-/-} e WT in mutanti *Cx3cr1*^{-/-}; i soggetti hanno un aumento di peso simile ma emerge come i topi che hanno riacquisito il

recettore abbiano un leggero miglioramento nella tolleranza al glucosio sebbene non varino significativamente i livelli dei macrofagi M1 e M2 (Fig.7A-7C). Di fatto il segnale protegge dall'infiammazione e dall'intolleranza al glucosio indotte dalla condizione di obesità.

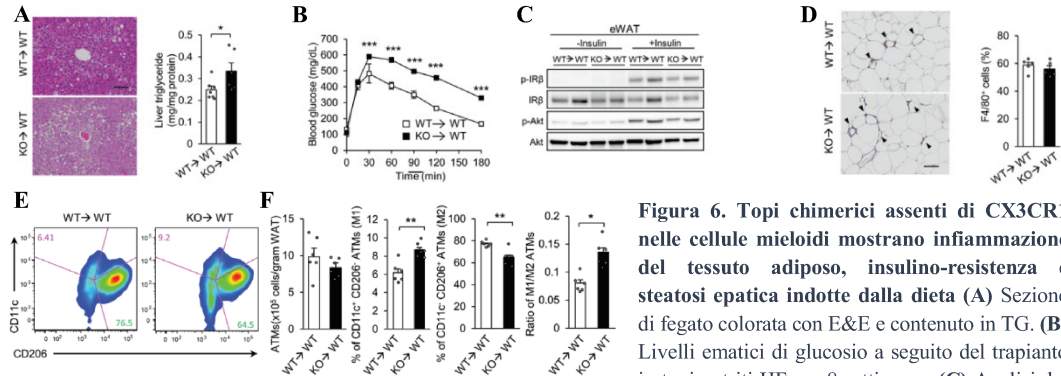


Figura 6. Topi chimerici assenti di CX3CR1 nelle cellule mieloidi mostrano infiammazione del tessuto adiposo, insulino-resistenza e steatosi epatica indotte dalla dieta (A) Sezione di fegato colorata con E&E e contenuto in TG. **(B)** Livelli ematici di glucosio a seguito del trapianto in topi nutriti HF per 8 settimane. **(C)** Analisi del segnale dell'insulina in eWAT di topi KO to WT nutriti con dieta HF. **(D)** Infiltrazione di macrofagi in eWAT di topi *Cx3cr1*^{-/-} to WT e WT to WT nutriti con dieta HF per 9 settimane, analisi in immunostaining con Ab anti-F4/80. **(E)** Analisi dei macrofagi M1 e M2 nel tessuto adiposo di topi *Cx3cr1*^{-/-} to WT e WT to WT nutriti con dieta HF. **(F)** Quantificazione dei macrofagi totali e dei profili M1/M2 in eWAT in topi nutriti con dieta HF per 6 settimane. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

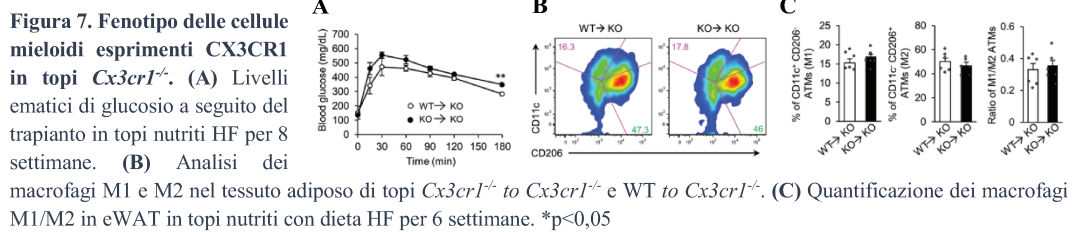


Figura 7. Fenotipo delle cellule mieloidi esponenti CX3CR1 in topi *Cx3cr1*^{-/-}. **(A)** Livelli ematici di glucosio a seguito del trapianto in topi nutriti HF per 8 settimane. **(B)** Analisi dei macrofagi M1 e M2 nel tessuto adiposo di topi *Cx3cr1*^{-/-} to *Cx3cr1*^{-/-} e WT to *Cx3cr1*^{-/-}. **(C)** Quantificazione dei macrofagi M1/M2 in eWAT in topi nutriti con dieta HF per 6 settimane. *p<0,05

3.5 La rimozione di CX3CR1 promuove l'infiammazione del tessuto adiposo e l'insulino-resistenza nei topi *ob/ob*

Al fine di determinare il ruolo di CX3CR1 nei topi geneticamente obesi, si sono prodotti mutanti *Cx3cr1/ob* a partire dall'incrocio di topi *ob/ob* e topi *Cx3cr1*^{-/-}; fino alle 8 settimane di vita i topi *Cx3cr1/ob* hanno dimostrato un minor aumento di peso rispetto ai corrispettivi *ob/ob* per poi raggiungere un livello di adiposità simile. I topi *Cx3cr1/ob* sviluppano steatosi epatica, una alterata tolleranza al glucosio ed insulino-resistenza (Fig.8A, 8B, 8C, 8D); inoltre, i mutanti *Cx3cr1/ob* reclutano un maggior numero di macrofagi a livello del tessuto adiposo rispetto agli *ob/ob* (Fig.8E) sebbene la dimensione degli adipociti sia simile. Emerge poi come i topi *Cx3cr1/ob*, similmente a quanto osservato nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} obesi, abbiano un'espressione diminuita dei marker dei macrofagi M2 rispetto al controllo (Fig.8F). Infine, vi è un incremento dei segnali infiammatori nel tessuto adiposo epididimale dei topi *Cx3cr1/ob* (Fig.8G) così come si osserva un'alterata segnalazione da parte dell'insulina.

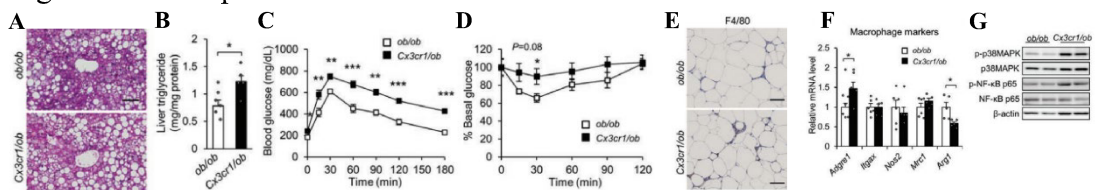


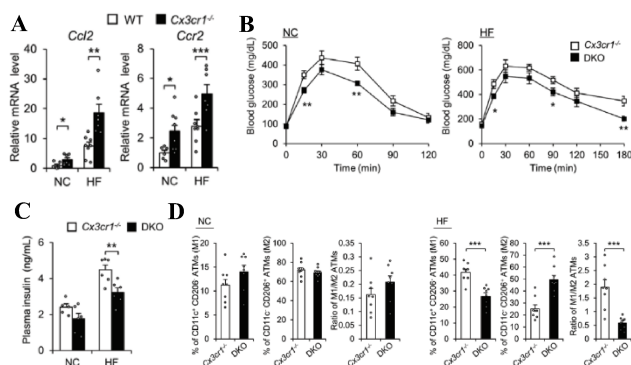
Figura 8. La mancanza di CX3CR1 nei topi *ob/ob* promuove l'infiammazione del tessuto adiposo, l'insulino-resistenza

e la steatosi epatica indotte dalla dieta. (A) Sezione di fegato colorata con E&E. (B) Contenuto in TG epatici. (C) Livelli ematici di glucosio. (D) Livelli plasmatici di insulina in topi *ob/ob* e *Cx3cr1/ob* a digiuno o nutriti. (E) Infiltrazione di macrofagi in eWAT di topi *ob/ob* e *Cx3cr1/ob* a 10 settimane, analisi in immunostaining con Ab anti-F4/80. (F) Espressione di marker dei macrofagi in eWAT di topi *ob/ob* e *Cx3cr1/ob*. (G) Analisi tramite Western Blot di p-p38MAPK, p-NF-kB p65 e proteine totali in eWAT di topi *Cx3cr1/ob*. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

3.6 Il blocco del segnale CCL2-CCR2 nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} attenua l'insulino-resistenza indotta dall'obesità attraverso uno shift verso il profilo M2

Studi recenti hanno dimostrato come il segnale CCL2-CCR2 sia essenziale per il reclutamento dei macrofagi a livello del tessuto adiposo e nell'insulino-resistenza. In effetti l'espressione di *Ccl2* e *Ccr2* è incrementata nel tessuto adiposo dei topi *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con la dieta HF rispetto ai WT (Fig.9A). Si sono quindi generati topi DKO per *Cx3cr1* e *Ccl2* incrociando individui *Cx3cr1*^{-/-} e *Ccl2*^{-/-}; i mutanti DKO presentano un peso corporeo simile ai ceppi parentali ma, diversamente da questi, i mutanti *Cx3cr1*^{-/-} KO per *Ccl2* esibiscono un miglioramento per quanto riguarda l'intolleranza al glucosio e l'iperinsulinemia indotte dalla dieta HF (Fig.9B e 9C). Infine, è stato dimostrato che i livelli di macrofagi M1 e M2 nel tessuto adiposo rimangono costanti tra genotipi diversi nutriti con la medesima dieta; tuttavia è emerso come nei topi DKO nutriti con la dieta HF vi sia una diminuzione del 40% del numero di macrofagi M1 ed un aumento del 91% degli M2 (Fig. 9D).

Figura 9. La mancanza di CCL2 nei topi *Cx3cr1*^{-/-} attenua l'insulino-resistenza e l'infiammazione del tessuto adiposo tramite una riduzione significativa del rapporto M1/M2. (A) Espressione di *Ccl2* e *Ccr2* in eWAT di topi WT e *Cx3cr1*^{-/-} nutriti NC o HF. **(B)** Analisi del glucosio ematico. **(C)** Livelli plasmatici di insulina in topi nutriti. **(D)** Quantificazione dei macrofagi M1/M2 in eWAT in topi nutriti con dieta NC o HF per 16 settimane. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



3.7 CX3CL1 protegge dall'insulino-resistenza indotta dall'obesità

La diminuzione dei livelli di CX3CL1 nel tessuto adiposo epididimale e nel plasma dei topi WT in condizione DIO evidenzia come questa chemochina possa avere effetti terapeutici sull'insulino-resistenza e sull'infiammazione indotte dalla dieta. L'espressione sistemica di *Cx3cl1*, prolungata per 28 gg ed ottenuta attraverso il vettore pLIVE nei topi WT-DIO, ha evidenziato come il peso dell'individuo non dipenda da tale chemochina; contrariamente, la presenza di CX3CL1 nei topi WT-DIO attenua l'intolleranza al glucosio e l'iperinsulinemia, diminuendo di fatto i livelli di insulina nel sangue (Fig.10A e 10B). Inoltre, CX3CL1 rafforza la segnalazione da parte dell'insulina nel fegato e nel tessuto adiposo epididimale dei topi WT-DIO. Sebbene non vi sia una differenza significativa nella steatosi epatica e nella massa delle cellule β tra gli individui trattati con CX3CL1 ed il controllo, è possibile osservare come i livelli di espressione di *Ccl2* e *Tnf* siano decresciuti nel fegato, ma non nel tessuto adiposo epididimale, dei topi in cui è stato iniettato il vettore pLIVE-CX3CL1 rispetto al controllo (Fig.10C). Infine, esperimenti

analoghi operati su mutanti *Cx3cr1*^{-/-} hanno evidenziato come l'espressione costitutiva di CX3CL1 non conduca a miglioramenti rilevanti in merito alla steatosi epatica o all'intolleranza al glucosio (Fig.11A, 11B, 11C).

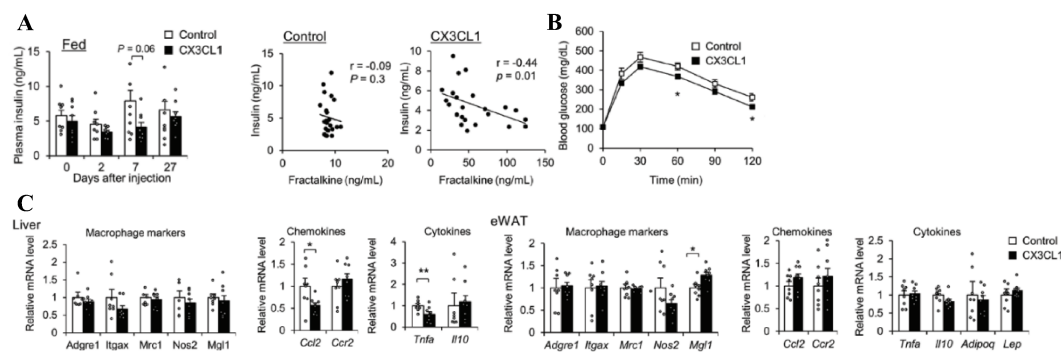
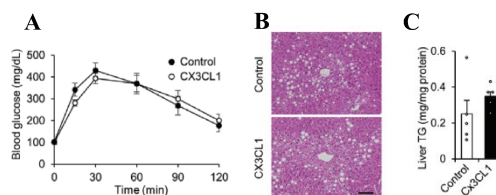


Figura 10. Il trattamento con CX3CL1 migliora il grado di sensibilità all'insulina indotta dalla dieta. (A) Livelli plasmatici di insulina a seguito dell'iniezione idrodinamica del vettore e correlazione con i livelli di CX3CL1 rispetto al controllo. (B) Livelli ematici di glucosio in topi WT-DIO a 14 giorni dall'iniezione idrodinamica del vettore di controllo o contenente *Cx3cl1*. (C) Espressione dei marker dei macrofagi, chemochine e citochine nel fegato ed in eWAT di topi iniettati col vettore di controllo o contenente *Cx3cl1*. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Figura 11. Il trattamento con CX3CL1 non ha effetti sull'insulino-resistenza indotta dalla dieta nei topi *Cx3cr1*^{-/-}. (A) Livelli ematici di glucosio a 14 giorni dall'iniezione idrodinamica del vettore di controllo o contenente *Cx3cl1*. (B) Sezione di fegato colorata con E&E. (C) Contenuto in TG epatici.



3.8 Discussione

Lo studio ha dimostrato che la mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 promuove l'insulino-resistenza e l'infiammazione indotte dalla condizione di obesità (genetica o favorita dalla dieta) attraverso la polarizzazione dei macrofagi verso un profilo M1 nel tessuto adiposo epididimale; inoltre, si è resa apprezzabile una diminuzione nell'espressione di *Cx3cl1* durante lo sviluppo dell'obesità ed un'espressione preferenziale di ligando e recettore a livello dei macrofagi. È quindi emerso che l'assenza di CX3CR1 nei topi DIO ed *ob/ob* e nelle cellule mieloidi conduce ad un aggravamento delle condizioni di insulino-resistenza ed infiammazione del tessuto adiposo mentre, di contro, l'assenza del segnale CCL2-CCR2 nei topi *Cx3cr1*^{-/-} DIO attenua tali fenomeni; quindi, i due segnali regolano l'insulino-resistenza e l'infiammazione indotte dalla condizione obesa, nonché la polarizzazione M1/M2, in maniera indipendente ed opposta. Studi antecedenti hanno evidenziato la presenza di 2 polimorfismi (V249I e T280M) associati a condizioni patologiche nel gene *CX3CR1* umano per i quali il legame con CX3CL1 era molto debole; ciò ha suggerito che il segnale possa essere depotenziato nei pazienti obesi. È noto che l'aumento dell'espressione di *Tnf* sia correlato alla presenza di macrofagi M1 dal momento che questi sono la sorgente principale di TNF- α ; lo studio ha infatti evidenziato un aumento del numero di macrofagi nel tessuto adiposo nei mutanti *Cx3cr1*^{-/-} DIO ed un conseguente aumento dell'espressione di *Tnf* e *Ccl2*. Si è quindi analizzato il ruolo del segnale CX3CL1-CX3CR1 nei macrofagi generando topi chimerici assenti di *Cx3cr1* nelle cellule mieloidi, dimostrando come queste siano

sufficienti a favorire la steatosi epatica e l'insulino-resistenza indotte dalla dieta nonché un aumento dell'infiltrazione dei macrofagi M1 a sfavore degli M2; questo ha evidenziato come l'assenza del segnale nelle cellule mieloidi sia importante nel promuovere e mantenere le condizioni patologiche indotte dalla condizione di obesità. Come già evidenziato, CCR2 e CX3CR1 sono cruciali nel determinare il sottoinsieme di monociti nel sangue, pertanto i monociti CCR2⁺Ly6C^{hi} si differenzieranno in macrofagi M1 mentre quelli CX3CR1⁺Ly6C⁻ negli M2; i risultati hanno dimostrato che la mancanza del segnale CX3CL1-CX3CR1 induce un aumento consistente nel numero di monociti Ly6C^{hi}, e dunque dei macrofagi M1, nei topi nutriti con entrambe le diete. Questo chiarisce il ruolo chiave del segnale nella caratterizzazione di monociti e macrofagi durante l'obesità precoce, ma soprattutto mette in luce come l'assenza di CX3CR1 sui macrofagi induca un aumento del fenotipo pro-infiammatorio. Diversamente, CX3CL1 favorisce la polarizzazione verso il profilo M2. Lo studio ha quindi dimostrato che la sovraespressione di CX3CL1 *in vivo* attenua l'intolleranza al glucosio ed aumenta la sensibilità all'insulina nel fegato e nel tessuto adiposo epididimale dei topi DIO, mentre diminuisce esclusivamente i livelli epatici di citochine pro-infiammatorie; non si riscontrano invece variazioni a carico della steatosi epatica sebbene l'espressione prolungata possa avere un effetto protettivo. Tuttavia, l'incremento dei livelli plasmatici di CX3CL1 nei topi *Cx3cr1*^{-/-} non ha avuto effetti sulla sensibilità all'insulina, suggerendo di fatto che gli effetti protettivi della chemochina sono mediati dalla presenza stessa del suo recettore; è stato comunque possibile attribuire al segnale CX3CL1-CX3CR1 il ruolo di target per il trattamento dell'obesità e del diabete mellito di tipo II. Inoltre, i risultati hanno evidenziato che nei topi WT e mutanti *Cx3cr1*^{-/-} nutriti con la dieta HF si ha un incremento della dimensione degli isolotti pancreatici contenenti cellule β sebbene non vari il tasso di proliferazione delle cellule stesse. Infine, lo studio ha permesso di definire come l'attenuazione dell'iperinsulinemia indotta da CX3CL1 non sia dovuta ad una regolazione diretta della secrezione di insulina da parte delle cellule β , ma piuttosto dal miglioramento della sensibilità all'insulina.

Riassumendo, i risultati dello studio hanno suggerito il ruolo essenziale che il segnale CX3CL1-CX3CR1 ricopre nelle condizioni di insulino-resistenza ed infiammazione indotte dalla dieta, regolando il profilo M1/M2 assunto dai macrofagi; in particolar modo l'assenza dello stesso induce una polarizzazione dei macrofagi verso un profilo pro-infiammatorio ed aggrava le condizioni di insulino-resistenza, di diabete e di steatosi epatica non alcolica. Inoltre, si è potuto sottolineare la potenziale utilità clinica dello studio del segnale CX3CL1-CX3CR1 al fine di migliorare il diabete mellito di tipo II.

BIBLIOGRAFIA

1. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-643. doi:[10.1038/35007508](https://doi.org/10.1038/35007508)
2. Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M, Nisoli E. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord*. 2018;23(2):149-157. doi:[10.1007/s40519-018-0481-6](https://doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6)
3. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-867. doi:[10.1038/nature05485](https://doi.org/10.1038/nature05485)
4. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: A Potential New Target for Inflammatory Diseases. *Molecular Interventions*. 2010;10(5):263-270. doi:[10.1124/mi.10.5.3](https://doi.org/10.1124/mi.10.5.3)
5. White GE, Greaves DR. Fractalkine: one chemokine, many functions. *Blood*. 2009;113(4):767-768. doi:[10.1182/blood-2008-11-189860](https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-189860)
6. Liu W, Jiang L, Bian C, et al. Role of CX3CL1 in Diseases. *Arch Immunol Ther Exp*. 2016;64(5):371-383. doi:[10.1007/s00005-016-0395-9](https://doi.org/10.1007/s00005-016-0395-9)
7. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-6440. doi:[10.1002/jcp.26429](https://doi.org/10.1002/jcp.26429)
8. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015;72:4-15. doi:[10.1016/j.peptides.2015.04.012](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012)
9. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*. 2018;120(1). doi:[10.1002/cpim.40](https://doi.org/10.1002/cpim.40)

APPENDICE

Nagashimada M, Sawamoto K, Ni Y, et al. CX3CL1-CX3CR1 Signaling Deficiency Exacerbates Obesity-induced Inflammation and Insulin Resistance in Male Mice. *Endocrinology*. 2021;162(6):bqab064. doi:[10.1210/endocr/bqab064](https://doi.org/10.1210/endocr/bqab064)

Research Article

CX3CL1-CX3CR1 Signaling Deficiency Exacerbates Obesity-induced Inflammation and Insulin Resistance in Male Mice

Mayumi Nagashimada,^{1,2} Kazuki Sawamoto,¹ Yinhua Ni,^{1,3} Hironori Kitade,¹ Naoto Nagata,¹ Liang Xu,¹ Masuko Kobori,⁴ Naofumi Mukaida,⁵ Tatsuya Yamashita,¹ Shuichi Kaneko,¹ and Tsuguhito Ota¹

¹Advanced Preventive Medical Sciences Research Center, Kanazawa University, Kanazawa, Japan; ²Division of Health Sciences, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa, Japan; ³College of Biological Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, China; ⁴Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan; and ⁵Division of Molecular Bioregulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

ORCID number: 0000-0003-2714-6395 (M. Nagashimada).

Abbreviations: ATM, adipose tissue macrophage; CCR2, C-C chemokine receptor 2; FACS, fluorescence-activated cell sorting; GTT, glucose tolerance test; H&E, hematoxylin and eosin; IL, interleukin; IR β , insulin receptor β -subunit; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF- κ B, nuclear factor κ B; SVF, stromal vascular fraction; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; Tnf, tumor necrosis factor; WAT, white adipose tissue

Received: 2 December 2020; Editorial Decision: 20 March 2021; First Published Online: 25 March 2021; Corrected and Typeset: 22 May 2021.

Abstract

The CX3CL1-CX3CR1 system plays an important role in disease progression by regulating inflammation both positively and negatively. We reported previously that C-C chemokine receptors 2 and 5 promote obesity-associated adipose tissue inflammation and insulin resistance. Here, we demonstrate that CX3CL1-CX3CR1 signaling is involved in adipose tissue inflammation and insulin resistance in obese mice via adipose tissue macrophage recruitment and M1/M2 polarization. *Cx3cl1* expression was persistently decreased in the epididymal white adipose tissue (eWAT) of high-fat diet-induced obese (DIO) mice, despite increased expression of other chemokines. Interestingly, in *Cx3cr1*^{-/-} mice, glucose tolerance, insulin resistance, and hepatic steatosis induced by DIO or leptin deficiency were exacerbated. CX3CL1-CX3CR1 signaling deficiency resulted in reduced M2-polarized macrophage migration and an M1-dominant shift of macrophages within eWAT. Furthermore, transplantation of *Cx3cr1*^{-/-} bone marrow was sufficient to impair glucose tolerance, insulin sensitivity, and regulation of M1/M2 status. Moreover, *Cx3cl1* administration in vivo led to the attenuation of glucose intolerance and insulin resistance. Thus, therapy targeting the CX3CL1-CX3CR1 system may be beneficial in the treatment of type 2 diabetes by regulating M1/M2 macrophages.

Key Words: chemokine, obesity, insulin resistance, inflammation, macrophage polarization

Obesity is a state of chronic low-grade inflammation. It has been reported that chronic inflammation is closely related to increase proinflammatory cytokines and chemokines. Especially, the accumulation of adipose tissue macrophages (ATMs) through C-C chemokine receptor 2 (CCR2) and its ligand CCL2 (also known as monocyte chemoattractant protein 1) is considered to be pivotal in the development of obesity-induced inflammation and insulin resistance (1-4). In addition, we reported previously that a different chemokine receptor, CCR5, promoted obesity-associated adipose tissue inflammation and insulin resistance (5, 6).

In the present study, we found that the expression of CX3CL1 was persistently decreased in epididymal white adipose tissue (eWAT). CX3CL1 (also known as fractalkine) is a CX3C chemokine involved in cell adhesion, recruitment, and survival through binding to the G protein-coupled receptor CX3CR1 (7-10). There is accumulating evidence that the CX3CL1-CX3CR1 system exerts both negative and positive effects on the pathogenesis and progression of different diseases. Highly enhanced CX3CL1-CX3CR1 signaling could induce inflammation in atherosclerosis (11-13), cardiovascular disease (14), and rheumatoid arthritis (15, 16) through the regulation of inflammatory macrophages and T lymphocytes. In addition, CX3CR1⁺ monocytes can differentiate into activated macrophages in many tissues (17). In contrast, enhancement of CX3CL1-CX3CR1 signaling had preventive effects on intestinal inflammation and colitis (18, 19), pancreatic β cell dysfunction (20), and diet-induced obesity (21). Furthermore, CX3CL1-CX3CR1 signaling during macrophage polarization induced accumulation of M2-like macrophages in skin cancer (22). However, the effects of the CX3CL1-CX3CR1 axis on ATM polarization, adipose inflammation, and insulin resistance on the development of obesity are still not clear.

Here, we show that loss of CX3CL1-CX3CR1 signaling exacerbates insulin resistance and inflammation in high-fat (HF) diet-induced obese (DIO) mice by causing a decrease in the number of anti-inflammatory M2-like macrophages and an increase in the number of proinflammatory M1-like macrophages. Importantly, administration of CX3CL1 improved glucose tolerance and insulin resistance in DIO mice, suggesting that the CX3CL1-CX3CR1 system may be a novel target for the treatment of obesity-induced type 2 diabetes.

Materials and Methods

Mouse models

C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (Yokohama, Japan). *Cx3cr1*^{-/-} mice and

Ccl2^{-/-} mice were kindly provided by N. Mukaida (Kanazawa University, Ishikawa, Japan). The mice were generated as reported previously (11, 12, 23). C57BL/6J mice and *Cx3cr1*^{-/-} mice were fed normal chow (NC), in which 10% of calories were from fat (CRF-1; Charles River Laboratories), or an HF diet consisting of 60% fat (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA). We compared *Cx3cr1*^{-/-} mice and their wild-type (WT) littermates. All mice were maintained under a 12 h/12 h light/dark cycle and given free access to food and water. All mice were males with a C57BL/6 background. The glucose tolerance test (GTT) was conducted after an overnight fast, and the mice were then injected intraperitoneally (ip) with 2 g/kg glucose. The insulin tolerance test was performed after a 4 h fast; mice were injected ip with 0.5 U/kg insulin. All experiments and animal procedures were performed in accordance with the standards set forth in the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Gene Recombination Experiment Safety Committee and the Institute for Experimental Animal Committee of Kanazawa University.

Cell culture experiments

Peritoneal macrophages were isolated and cultured as described previously (24). Eight-week-old male WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice were injected with 4% (w/v) thioglycolate. Peritoneal macrophages were isolated 48 h later and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum. After 6 h of starvation, cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 1, 10, 100, or 1000 ng/mL or with interleukin 4 (IL-4; R&D Systems) at 1, 10, or 100 ng/mL for 16 h in 6-well plates at 37°C under 5% (v/v) CO₂.

DNA microarray analysis

Total RNA was extracted from eWAT using an messenger RNA (mRNA) Miniprep Kit (Roche, Basel, Switzerland). Fragmented biotin-labeled complementary RNA was synthesized from the total RNA of each mouse using a GeneChip 3 IVT Express Kit (Affymetrix Japan KK, Tokyo, Japan) and then hybridized to a GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array (Affymetrix). After hybridization, the probe array was stained using the GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) and then scanned using the GeneChip Scanner 3000 instrument (Affymetrix) and GeneChip Operation Software (ver. 1.4; Affymetrix). Analysis of DNA microarray data was performed using Microarray Suite 5.0 (Affymetrix) and GeneSpring (v. 11.5; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The data are accessible through Gene Expression

Omnibus Series accession number GSE167311 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE167311>).

Quantitative real-time polymerase chain reaction

Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed as described previously (5, 25). Total RNA was extracted from frozen adipose tissue and other tissues using a High Pure RNA Tissue Kit (Roche). Complimentary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using a High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR was performed on a CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Standard curves were generated for relative quantification of specific PCR products for each primer set (Table 1). mRNA levels were normalized relative to the amount of 18S rRNA and expressed in arbitrary units. Levels of S18 transcript were used for normalization.

Plasma protein measurements

Plasma triglycerides (TG), total cholesterol (TC), nonesterified fatty acid, glucose, insulin levels (26), and hepatic TG levels were measured as described previously (5, 25). Plasma fractalkine (R&D Systems) (27) and TNF- α (Thermo Fisher Scientific) (28) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Immunoblotting

Total tissues were homogenized and sonicated in radio immunoprecipitation assay lysis buffer (Millipore, Bedford,

MA, USA) supplemented with protease inhibitors and PhosStop (Roche). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto polyvinylidene fluoride or polyvinylidene difluoride membranes (Millipore) and probed with anti-phospho (p)-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (29), anti-p38 MAPK (30), anti-p-nuclear factor κ B (NF- κ B) p65 (31), anti-NF- κ B (32), anti-p-Tyr1146 insulin receptor β subunit (IR β) (33), anti-IR β (34), anti-p-protein kinase B (Akt) (35), anti-Akt (cell signaling) (36), and monoclonal anti- β -actin (Sigma-Aldrich) (37) antibodies.

Histological analysis

Paraffin-embedded eWAT, liver, and pancreatic tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and immunohistochemically stained for F4/80 (Abcam, Cambridge, UK) (38), insulin (Abcam) (39), glucagon (Sigma-Aldrich) (40), Ki67 (Abcam) (41), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (Dojindo). The macrophage area was measured in 5 randomly selected fields at 200 \times magnification for each mouse ($n = 4-6$ mice per group). Relative β cell areas were calculated by dividing the area of insulin-positive cells by the total pancreatic area measured using an AxioVision system (Carl Zeiss, Dublin, CA, USA) ($n = 3-5$ mice per group).

Whole-mount immunostaining of eWAT was performed as described previously (42). Mice were perfused with 1% paraformaldehyde, and the eWAT was dissected out and stained with rat antimouse F4/80 (Abcam), rabbit anti-CX3CR1 (Abcam) (43), rabbit anti-CX3CL1 (Torrey Pines Biolabs, Secaucus, NJ, USA) (44), rat anti-CD206 (Bio-Rad) (45), hamster anti-CD11c (Bio-Rad) (46), and guinea pig antiperilipin

Table 1. Primer sequence for quantitative real-time polymerase chain reaction

Gene	5' Primer	3' Primer
<i>mCx3cr1</i>	CCG CCA ACT CCA TGA ACA A	CGT CTG GAT GAT GCG GAA GTA
<i>mCx3cl1</i>	CAC CTC GGC ATG ACG AAA T	TTG TCCA CCC GCT TCT CAA
<i>mCcl2</i>	AGG TCC CTG TCA TGC TTC TGG	CTG CTG CTG GTG ATC CTC TTG
<i>mCcr2</i>	ATT CTC CAC ACC CTG TTT CG	GAT TCC TGG AAG GTG GTC AA
<i>mAdgre1</i>	CTT TGG CTA TGG GCT TCC AGT C	GCA AGG AGG ACA GAG TTT ATC GTG
<i>mTnf</i>	AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA	GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG
<i>mIl1b</i>	CTG AAC TCA ACT GTG AAA TGC CA	AAA GGT TTG GAA GCA GCC CT
<i>mIl10</i>	GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG	CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG
<i>mMrc1</i>	CAA GGA AGG TTG GCA TTT GT	CCT TTC AGT CCT TTG CAA GC
<i>mMgl1</i>	TGA GAA AGG CTT TAA GAA CTG GG	GAC CAC CTG TAG TGA TGT GGG
<i>mItgax</i>	AAA ATC TCC AAC CCA TGC TG	CAC CAC CAG GGT CTT CAA GT
<i>mNos2</i>	AAT CTT GGA GCG AGT TGT GG	CAG GAA GTA GGT GAG GGC TTG
<i>mLeptin</i>	AAG AAG ATC CCA GGG AGG AA	TGA TGA GGG TTT TGG TGT CA
<i>mAdiponectin</i>	AGC CGC TTA TAT GTA TCG CTC A	TGC CGT CAT AAT GAT TCT GTT GG
<i>18SrRNA</i>	GGA GAA CTC ACG GAG GAC GA	CCA GTG GTC TTG GTG TGC TG

(Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA) (47) antibodies overnight at 4°C. To detect signals, appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 (48-50) or Alexa Fluor 594 (51-53) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Thermo Fisher Scientific) were used. Samples were visualized under an inverted confocal microscope using an LSM5 PASCAL system (Carl Zeiss).

Isolation of adipocytes and stromal vascular fraction cells

Epididymal fat pads from male C57BL/6J mice fed the NC or HF diet were minced with scissors and digested for 20 min at 37°C with type II collagenase (Sigma-Aldrich) in PBS containing 2% BSA (pH 7.4). The cell suspension was filtered through a 100- μ m filter and then centrifuged at 300 \times g for 5 min to separate the floating adipocyte fraction from the SVF cells. Both fractions were used for RNA extraction or flow cytometric analysis.

Flow cytometric analysis

SVF cells were resuspended in PBS supplemented with 2% fetal bovine serum and incubated with Fc-Block (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), followed by incubation with fluorochrome-conjugated antibodies as described previously (5, 54, 55). Cells were analyzed using FACSaria II (BD Biosciences), and data were acquired with FACSDiva software (version 6.0; BD Biosciences). Data analysis was performed using FlowJo software (Tomy Digital Biology, Tokyo, Japan). Unstained, single stained, and fluorescence minus 1 controls were used to set compensation and gates. Polyimide was used to identify live cells.

GTT and insulin tolerance test

The GTT was performed after an overnight fast. After baseline blood collection, mice were injected ip with glucose (2 g/kg body weight). Blood samples were collected 15, 30, 60, 90, 120, and 180 min later for determination of glucose and insulin levels. The insulin tolerance test was performed after a 4 h fast. Mice were injected ip with human insulin (0.75 U/kg for HF-diet-fed mice and 1.5 U/kg for *Cx3cr1/ob* and *ob/ob* littermates). All blood samples were collected by cutting the tail 1 to 2 mm from the tip with sharp scissors. The blood glucose level was measured using glucose test strips and a glucose enzyme-linked immunosorbent assay kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) as described previously (24, 25).

Bone marrow transplantation

Bone marrow cells were collected from the femurs and tibias of 8-week-old *Cx3cr1^{-/-}* or C57BL/6J (WT) mice and transplanted via the tail vein into lethally irradiated (10 Gy) recipient WT mice with a minimum cell dose of 10⁷ cells. The following groups of chimeric mice were generated: WT to WT, *Cx3cr1^{-/-}* to WT, WT to *Cx3cr1^{-/-}*, and *Cx3cr1^{-/-}* to *Cx3cr1^{-/-}*. Transplanted mice could recover for 4 weeks to reconstitute their hematopoietic systems. Genomic DNA was extracted from peripheral blood. Mice were then placed on the NC or HF diet for 8 weeks and the GTT was performed. Tissues were harvested after 10 weeks of feeding on the specified diet.

Effects of CX3CL1 treatment on diet-induced obesity

Full-length CX3CL1 cDNA was obtained from mouse liver tissue by PCR. CX3CL1 cDNA was cloned into the pLIVE vector (Mirus Bio, Madison, WI, USA). The control vector was pLIVE vector without any insert. After feeding with the HF diet for 6 weeks, C57BL/6J and *Cx3cr1^{-/-}* mice were injected with either pLIVE-CX3CL1 or control vector at a dose of 10 μ g/mouse suspended in 2 mL of TransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus Bio) (56).

Statistics

All data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between 2 groups were performed using the 2-tailed Student's *t*-test. All analyses were performed using IBM SPSS Statistics (version 24; IBM Corp., Armonk, NY, USA). The gene expression levels obtained by DNA microarray analysis were compared among mouse groups using Welch's 1-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test with Benjamini-Hochberg adjustment for multiple corrections. Genes that were significantly differentially expressed between 2 groups were further analyzed by Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood, CA, USA).

Results

Cx3cl1 expression is downregulated in the adipose tissue of obese mice

We first compared the gene expression of various chemokines and their receptors between the eWAT of DIO mice and lean mice fed NC using DNA microarray analysis. Consistent with previous studies, monocyte chemoattractant protein 1-CCR2 and CCL5-CCR5 signaling were enhanced during the development of obesity (Fig. 1A).

Surprisingly, we found that the expression of *Cx3cl1* was decreased in the eWAT of DIO mice (Fig. 1A). In addition, real-time PCR analysis confirmed that *Cx3cl1* mRNA was downregulated only in eWAT and not in other tissues of DIO mice (Fig. 1B). The mRNA levels of *Ccl2* and its receptor, *Ccr2*, were increased in eWAT between 8 and 20 weeks after starting the HF diet and in *ob/ob* mice at 8 weeks old. Interestingly, *Cx3cl1* expression continued to decline during HF feeding and decreased markedly in *ob/ob* mice at 8 weeks of age, while *Cx3cr1* expression showed no significant difference (Fig. 1C and 1D). Furthermore, the plasma *Cx3cl1* concentration was significantly reduced in DIO mice compared with lean mice (Fig. 1E). We next investigated the cellular sources of *Cx3cl1* and *Cx3cr1* gene expression in the eWAT of DIO and lean mice. The mRNA levels of *Cx3cl1* and *Cx3cr1* in adipocytes and a macrophage-containing stromal vascular fraction (SVF) of eWAT were determined using real-time PCR. *Cx3cl1* and *Cx3cr1* expression was higher in the SVF than in the adipocyte fraction in DIO and lean mice (Fig. 1F). Moreover, *Cx3cl1* expression in SVF was markedly decreased after starting the HF diet. Immunostaining revealed that *Cx3cr1* and *Cx3cl1* were expressed mainly in F4/80⁺ macrophages, and not in perilipin⁺ adipocytes. Moreover, both *Cx3cr1* and *Cx3cl1* were expressed in CD11c⁺CD206⁻ M1-like ATMs and CD11c⁻CD206⁺ M2-like ATMs (Fig. 1G). Together, the results showed that the expression of *Cx3cl1* was downregulated in the eWAT of obese mice.

Deficiency of CX3CL1-CX3CR1 signaling exacerbates diet-induced insulin resistance, hepatic steatosis, and adipose tissue inflammation

To clarify the impact of CX3CL1-CX3CR1 signaling on obesity-induced insulin resistance and inflammation *in vivo*, we analyzed the metabolic phenotype in WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet for 16 weeks. WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice showed similar weight gain (Fig. 2A). Our findings indicated that sex had no effect on body weight gain in *Cx3cr1*^{-/-} mice on the HF diet (data not shown). Adipose tissue weight, liver weight, and fasting plasma glucose levels were not significantly different between *Cx3cr1*^{-/-} and WT mice maintained on either the NC or HF diet (Table 2). Plasma TG, TC, and nonesterified fatty acid levels tended to increase in *Cx3cr1*^{-/-} mice on either the NC or HF diet compared with WT controls (Table 2). Hepatic TG accumulation was increased in *Cx3cr1*^{-/-} mice on the HF diet (Fig. 2B). The GTT indicated impaired glucose tolerance in lean and obese *Cx3cr1*^{-/-} mice compared with WT mice (Fig. 2C and 2D). Moreover, HF

diet-induced hyperinsulinemia was significantly exacerbated in *Cx3cr1*^{-/-} mice (Fig. 2E). *Cx3cr1*^{-/-} mice showed marked increases in F4/80⁺ macrophage infiltration into adipose tissue and crown-like structure formation induced by the HF diet (Fig. 2F, 2G, and 2I). However, there was no significant difference in adipocyte size between *Cx3cr1*^{-/-} and WT mice (Fig. 2H). Obese *Cx3cr1*^{-/-} mice had significantly increased expression of *leptin*, while there was no significant differences in *adiponectin* gene expression (Fig. 2I). These findings were associated with augmented NF-κB p65 phosphorylation in *Cx3cr1*^{-/-} mice on the HF diet (Fig. 2J). Importantly, the gene expression levels of the M1 macrophage marker, *Itgax*, and inflammatory cytokine, *Tnf*, were higher in *Cx3cr1*^{-/-} mice than in WT mice on the NC or HF diet (Fig. 2I), but there was no difference in expression of the M2 macrophage marker, *Mrc1* (Fig. 2I). In addition, plasma levels of TNF-α were significantly higher in *Cx3cr1*^{-/-} mice than in WT mice fed the HF diet (Fig. 2K). Moreover, insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor β subunit (p-IRβ) and Akt (p-Akt) was decreased in the liver and eWAT of *Cx3cr1*^{-/-} mice compared with WT mice (Fig. 2L).

To examine the effects of CX3CR1 deficiency on β cell mass, we measured the size of insulin-positive islet cells by morphometric analysis. The islet size increased in both WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice on the HF diet. However, there was no significant difference in β cell mass or proliferation between WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice on the same diet (Fig. 3A-3D). The size of glucagon-positive α cells in *Cx3cr1*^{-/-} mice was also unaffected.

CX3CL1-CX3CR1 signaling causes a reciprocal increase in M1-like ATMs and decrease in M2-like ATMs

Next, macrophage infiltration and polarization were assessed. The infiltration of CD11c⁺CD206⁻ (M1-like) ATMs was increased in *Cx3cr1*^{-/-} mice compared with WT mice on either the NC or HF diet (Fig. 4A). We then examined the distributions of *Cx3cl1* and *Cx3cr1* in ATMs from DIO mice by immunofluorescence analysis and found that both M1-like and CD11c⁻CD206⁺ (M2-like) ATMs expressed *Cx3cl1* and *Cx3cr1* (Fig. 4A).

To quantify ATM subsets in WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice on the NC or HF diet, we performed flow cytometric analysis. *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC diet showed a 40.3% increase in M1-like macrophages and 17% decrease in M2-like macrophages compared with WT mice (Fig. 4B and 4D). Moreover, *Cx3cr1*^{-/-} mice on the HF diet had 39% more M1-like macrophages and 49% fewer M2-like macrophages than WT mice (Fig. 4C and 4E), which resulted in a predominance of M1 over M2 in the ATM population (Fig. 4D and

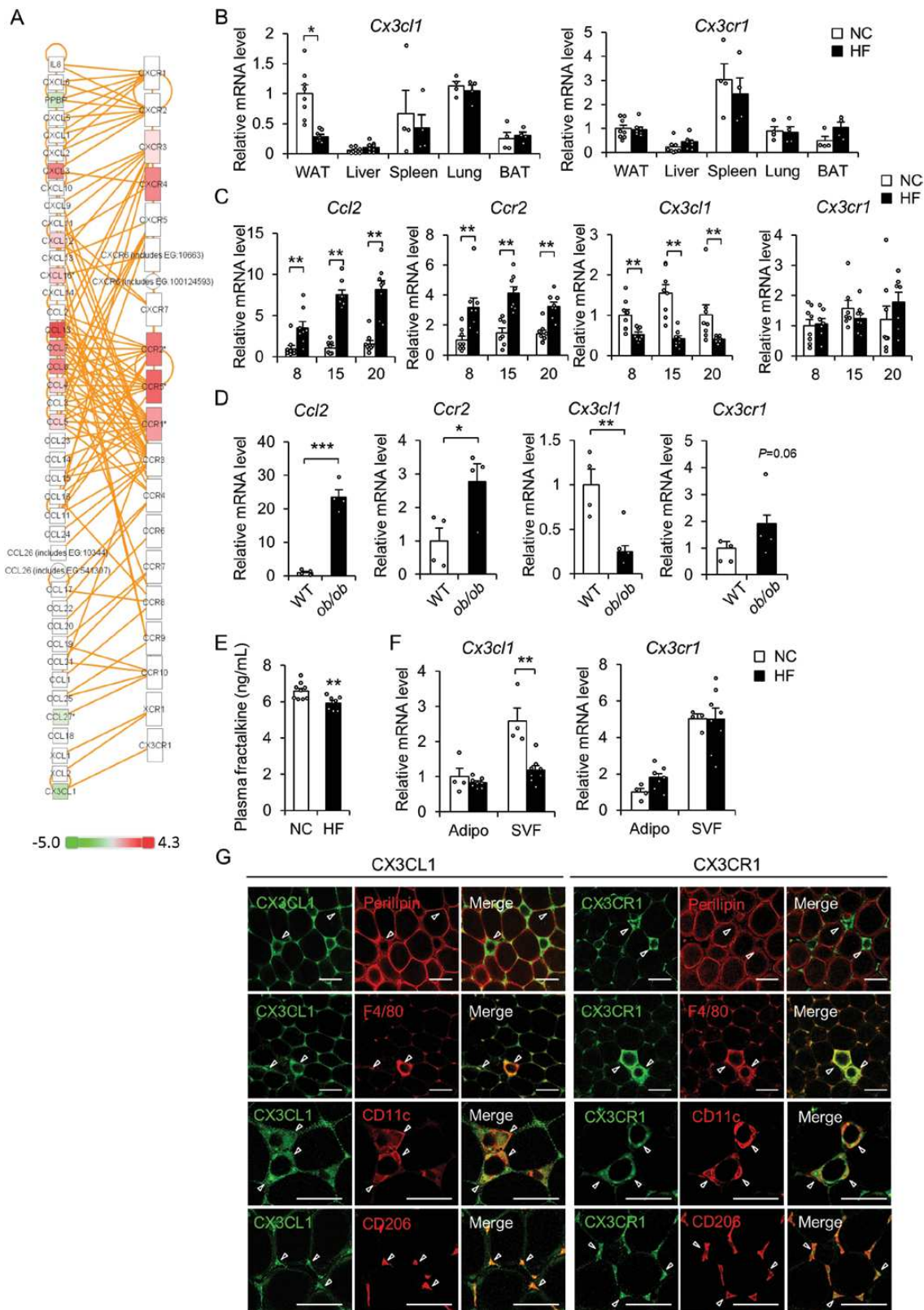


Figure 1. Cx3cl1 is downregulated in the eWAT of obese mice. (A) Changes in gene expression of chemokines and their receptors in the adipose tissue of WT fed the NC or HF diet for 8 weeks. Upregulated (red) and downregulated (green) genes in comparison with WT were detected by DNA microarray analysis ($n = 5$ per group). (B) Gene expression of *Cx3cl1* and its receptor *Cx3cr1* in various tissues of WT and DIO mice at 20 weeks old ($n = 4-8$ per group). (C and D) mRNA expression of receptors and their ligands in the adipose tissue of WT and DIO mice at 8, 15, and 20 weeks old and *ob/ob* mice at 8 weeks old ($n = 4$ per group). (E) Plasma Cx3cl1 protein levels were measured at 16 weeks old ($n = 8$ per group). (F) mRNA expression

4E). On the other hand, the total number of ATMs was not different between genotypes on the same diet (Fig. 4D and 4E). Furthermore, a predominance of lymphocyte antigen 6C (Ly6C)^{hi} over the Ly6C^{lo} monocyte population was also observed in both the peripheral blood and bone marrow cells of *Cx3cr1*^{-/-} mice (Fig. 4F-4J). In parallel, *Cx3cr1* deficiency increased the mRNA expression of LPS-induced M1 markers, such as *Tnf* and *Il1b*, in peritoneal macrophages, whereas *Cx3cr1* deficiency decreased the mRNA expression of IL-4-induced M2 markers, such as *Mrc1* and *Il10* (Fig. 5A). *Cx3cl1* alone had no effect on the expression of macrophage markers, but exposure of peritoneal macrophages to *Cx3cl1* decreased the expression of LPS-induced M1 macrophage markers in a dose-dependent manner. Moreover, exposure of macrophages to *Cx3cl1* increased the mRNA expression of M2 macrophage markers in the presence of IL-4 (Fig. 5B). Therefore, loss of CX3CL1-CX3CR1 signaling in macrophages resulted in a shift in polarization toward an inflammatory phenotype.

Transplantation of *Cx3cr1*^{-/-} bone marrow promoted metabolic dysfunction in mice

To further study the impact of CX3CR1 deficiency in bone marrow-derived macrophages, we transplanted bone marrow cells from age-matched WT or *Cx3cr1*^{-/-} mice into lethally irradiated WT mice, to generate myeloid cell-specific chimeric mice. To detect *Cx3cr1*^{-/-} cells in the blood of chimeric mice, which have loss of *Cx3cr1* only in myeloid cells (*Cx3cr1*^{-/-} to WT), we performed PCR on genomic DNA from whole blood with primers specific for the deletion mutant *neo* gene in the *Cx3cr1* targeting vector. The *neo* amplification product was not detected in samples of bone marrow transplanted from WT into WT (WT to WT) mice, but was present in all of the samples of bone marrow transplanted from *Cx3cr1*^{-/-} to WT mice (Fig. 6A).

To study the effects of the CX3CL1-CX3CR1 pathway in bone marrow-derived macrophages on glucose metabolism, WT to WT and *Cx3cr1*^{-/-} to WT mice were fed the HF diet for 12 weeks. Both groups of transplant recipient mice gained weight and developed a similarly moderate level of DIO (Fig. 6B). Bone marrow transplanted from *Cx3cr1*^{-/-} to WT mice exacerbated HF diet-induced hepatic steatosis (Fig. 6C), impaired glucose tolerance (Fig. 6D), and reduced insulin signaling (Fig. 6E), but did not

affect macrophage infiltration into eWAT (Fig. 6F). These results suggested that the transfer of *Cx3cr1*^{-/-} hematopoietic cells was sufficient to promote diet-induced alterations in glucose metabolism. However, lacking *Cx3cr1* only in myeloid cells caused a 30% increase in M1-like macrophages and 16.7% decrease in M2-like macrophages compared with WT mice, which resulted in a shift to an M1-like dominant ATM phenotype (Fig. 6G and 6H).

We next assessed the recovery of CX3CL1-CX3CR1 signaling in bone marrow-derived macrophages. We generated WT to *Cx3cr1*^{-/-} (WT to *Cx3cr1*^{-/-}) and *Cx3cr1*^{-/-} to *Cx3cr1*^{-/-} (*Cx3cr1*^{-/-} to *Cx3cr1*^{-/-}) mice, both of which showed similar weight gain (Fig. 7A). WT to *Cx3cr1*^{-/-} mice had slightly improved glucose tolerance (Fig. 7B). However, there were no differences in M1- or M2-like macrophages between the groups (Fig. 7C and 7D). Thus, CX3CL1-CX3CR1 signaling in bone marrow-derived cells protected against obesity-induced adipose tissue inflammation and glucose intolerance. These observations suggested that macrophage *Cx3cr1* propagates the inflammatory response to obesity. The chimeric mice lacked *Cx3cr1* only in myeloid cells derived from the bone marrow transplant (BMT).

CX3CR1 ablation promotes adipose tissue inflammation and insulin resistance in *ob/ob* mice

To further assess the role of CX3CR1 in genetically obese (*ob/ob*) mice, *Cx3cr1* and *leptin*-deficient (*Cx3cr1/ob*) mice were generated by crossing *Cx3cr1*^{-/-} and *ob/ob* mice. *Cx3cr1/ob* mice showed less weight gain than *ob/ob* mice until 8 weeks of age, but the adiposity was similar thereafter (Fig. 8A and 8B). *Cx3cr1/ob* mice developed hepatic steatosis (Fig. 8C and 8D), impaired glucose tolerance (Fig. 8E), and insulin resistance (Fig. 8F). Notably, *Cx3cr1/ob* mice had increased ATM recruitment compared with *ob/ob* littermates, although adipocyte size was similar between the groups (Fig. 8G-8I). Consistent with obese *Cx3cr1*^{-/-} mice, *Cx3cr1/ob* mice had markedly decreased expression of M2 macrophage markers compared with controls (Fig. 8J). Moreover, inflammatory signals were enhanced in the eWAT of *Cx3cr1/ob* mice (Fig. 8K), in association with impaired insulin signaling (Fig. 8L).

Figure 1: continued

of *Cx3cl1* and its receptor in the adipocyte fraction and SVF of eWAT of mice ($n = 4-8$ per group). (G) Immunocytochemical analysis of the epididymal adipose tissue of DIO mice with anti-cx3cl1 (green), anti-cx3cr1 (green), anti-F4/80 (red), anti-perilipin (red), anti-CD11c (red), and anti-CD206 (red) antibodies. Scale bar: 100 μm . Data in (B-E) are expressed as means \pm SEM and were analyzed by 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Abbreviations: BAT, brown adipose tissue; eWAT, epididymal white adipose tissue.

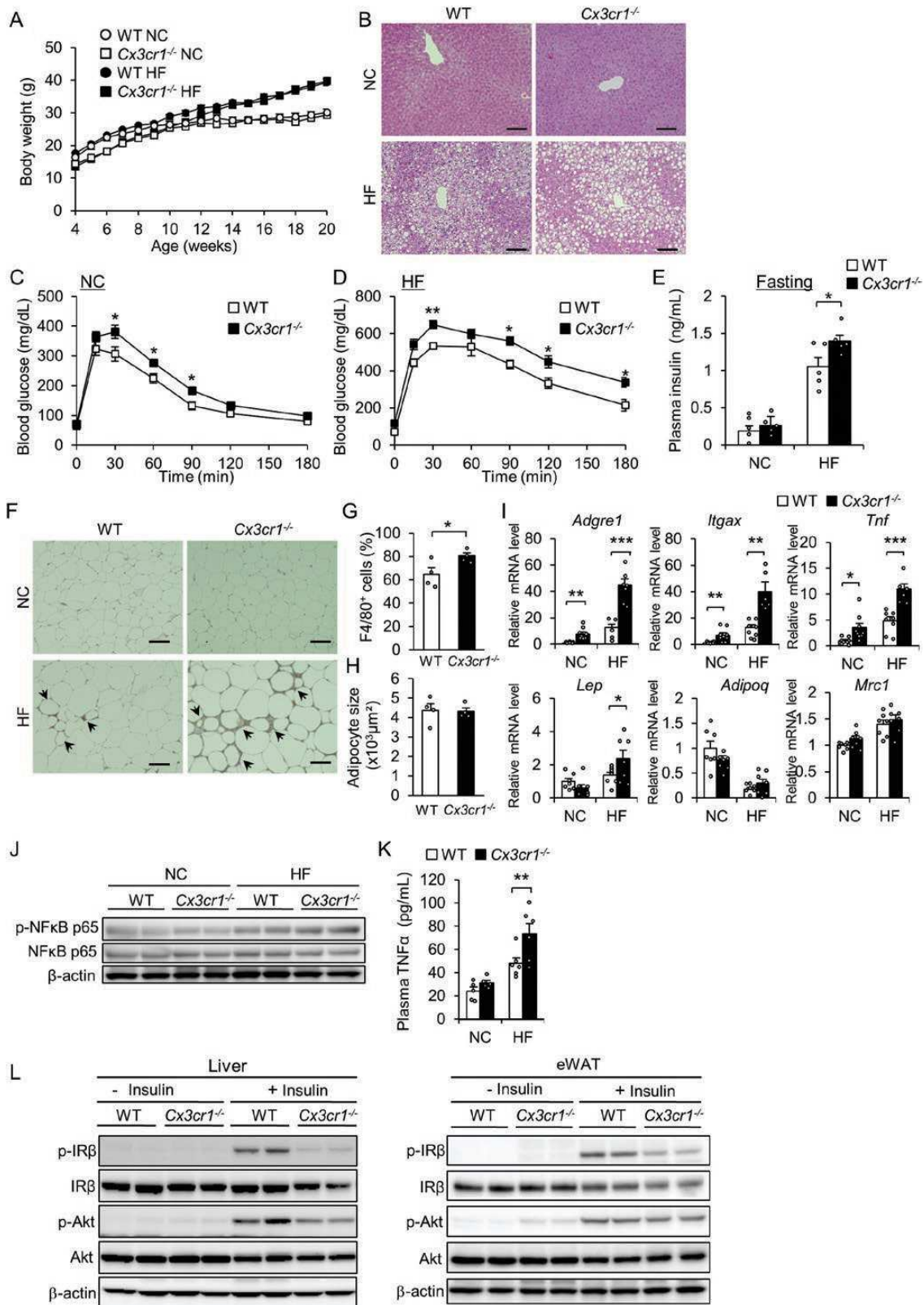


Figure 2. *Cx3cr1* deficiency promotes diet-induced insulin resistance, hepatic steatosis, and adipose tissue inflammation. (A) Body weights of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet for 16 weeks ($n = 7$ per group). (B) Representative images of HE-stained liver slices. Scale bar: 100 μm. (C and D) GTT ($n = 7$ per group). (E) Plasma insulin levels in the fasting state ($n = 5$ per group). (F) Macrophage infiltration in the eWAT of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet at 20 weeks old, as evaluated by F4/80 immunostaining. Scale bar: 100 μm. (G) The ratio of F4/80-stained cells to total cells counted in eWAT of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed on HF diet ($n = 4$ per group). (H) Adipocyte size of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet ($n = 4$

Table 2. Effect of HF diet on metabolic parameter at 12 weeks

	NC		HF	
	WT	<i>Cx3cr1</i> ^{-/-}	WT	<i>Cx3cr1</i> ^{-/-}
Weight (g)	27.0 ± 0.4	26.0 ± 0.4	40.0 ± 1.0	39.3 ± 0.8
Liver weight (g)	1.10 ± 0.02	1.03 ± 0.02	1.31 ± 0.14	1.16 ± 0.08
eWAT weight (g)	0.57 ± 0.05	0.70 ± 0.05	2.31 ± 0.13	2.37 ± 0.09
Glucose (mg/mL)	64.4 ± 6.1	71.6 ± 3.4	72.0 ± 8.7	115.8 ± 18.4
TG (mg/dL)	69.7 ± 13.7	109.4 ± 10.6*	86.8 ± 10.6	105.3 ± 7.7
Total cholesterol (mg/dL)	113.78 ± 3.98	83.6 ± 3.9**	183.0 ± 11.8	188.7 ± 15.4
Nonesterified fatty acid (mEq/L)	1.41 ± 0.3	2.1 ± 0.1	0.73 ± 0.08	0.85 ± 0.06

Data are means ± standard error and were obtained from 20 weeks old fasted *Cx3cr1*^{-/-} mice and WT littermate controls (*n* = 4-10 mice/group). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs WT on the same diet.

Blockade of CCL2-CCR2 signaling in *Cx3cr1*^{-/-} mice attenuates obesity-induced insulin resistance via M2 dominant shift in ATMs

There is accumulating evidence that CCL2-CCR2 is important for ATM recruitment and insulin resistance. We found that *Ccl2* and *Ccr2* expression was increased in the adipose tissue of *Cx3cr1*^{-/-} mice in comparison with WT mice on the HF diet (Fig. 9A). To clarify the significance of CCL2-CCR2 and CX3CL1-CX3CR1 signaling in these processes, we generated *Ccl2* and *Cx3cr1* double knockout (DKO) mice by crossing *Ccl2*^{-/-} mice with *Cx3cr1*^{-/-} mice. DKO mice had similar body weights to their parental strains (Fig. 9B). However, HF diet-induced glucose intolerance and hyperinsulinemia in *Cx3cr1*^{-/-} mice were improved by knockout of *Ccl2* (Fig. 9C and 9D).

To assess the effects of *Ccl2* deletion on ATM subsets in *Cx3cr1*^{-/-} mice, we quantified M1 and M2 ATMs. The total number of ATMs was not different between genotypes on the same diet. However, DKO mice on the HF diet had 40% fewer M1 like macrophages and 91% more M2 like macrophages than WT mice, resulting in macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype (Fig. 9E and 9F).

Cx3cl1 protects against obesity-induced insulin resistance

The decreased levels of Cx3cl1 in the eWAT and plasma of DIO model of WT (DIO-WT) mice suggested that Cx3cl1 may exert therapeutic effects on obesity-induced

insulin resistance and inflammation. Therefore, we expressed Cx3cl1 systemically in DIO-WT mice via hydrodynamic tail vein injection of the pLIVE- Cx3cl1 vector. Weight gain was unaffected by Cx3cl1 in DIO-WT mice (Fig. 10A). Systemic Cx3cl1 expression was sustained until 28 days (Fig. 10B). Meanwhile, Cx3cl1 tended to attenuate hyperinsulinemia in DIO-WT mice (Fig. 10C), which was negatively correlated with the insulin level (Fig. 10D) and attenuated glucose intolerance in DIO-WT (Fig. 10E). In addition, Cx3cl1-enhanced insulin signaling in both the liver and eWAT of DIO-WT mice (Fig. 10F). While there was no significant difference in hepatic steatosis or β cell mass between Cx3cl1-treated and control mice (Fig. 10G and 10H), the levels of *Ccl2* and *Tnf* mRNA expression were decreased in the liver of Cx3cl1-injected mice compared with control mice (Fig. 10I), while no alterations were observed in eWAT (Fig. 10J). However, in similar experiments in *Cx3cr1*^{-/-} mice (Fig. 11A-11C) we found no significant improvement in glucose intolerance (Fig. 11D) or hepatic steatosis (Fig. 11E and 11F). These results suggested that Cx3cl1 may have therapeutic effects on obesity-induced glucose intolerance and insulin sensitivity.

Discussion

This study showed that CX3CL1-CX3CR1 signaling deficiency promoted obesity-induced inflammation and insulin resistance through polarization of M1 macrophages in eWAT. *Cx3cl1* mRNA expression was downregulated during the development of obesity. Furthermore, CX3CL1 and CX3CR1 were predominantly expressed

Figure 2: continued

per group). (I) mRNA expression of macrophage markers and TNF-α in eWAT from mice fed the NC or HF diet. Data were obtained from 20-week-old fasted *Cx3cr1*^{-/-} mice, with WT littermates used as controls (*n* = 5 per group). (J) Immunoblots of phosphorylated NF-κB p65 (p-NF-κB p65) and total proteins in the eWAT of mice. (K) Plasma TNF-α levels of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet (*n* = 5-6 per group). (L) Impaired insulin signaling in the liver and eWAT of *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the HF diet. Immunoblots of phospho-Tyr1146 insulin receptor β subunit (p-IRβ), IRβ, phospho-Ser473 Akt (p-Akt), Akt, and β-actin with or without intravenous insulin injection. The data in (C-E, G, I, and K) are expressed as means ± SEM and were compared using the 2-tailed Student's *t*-test; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

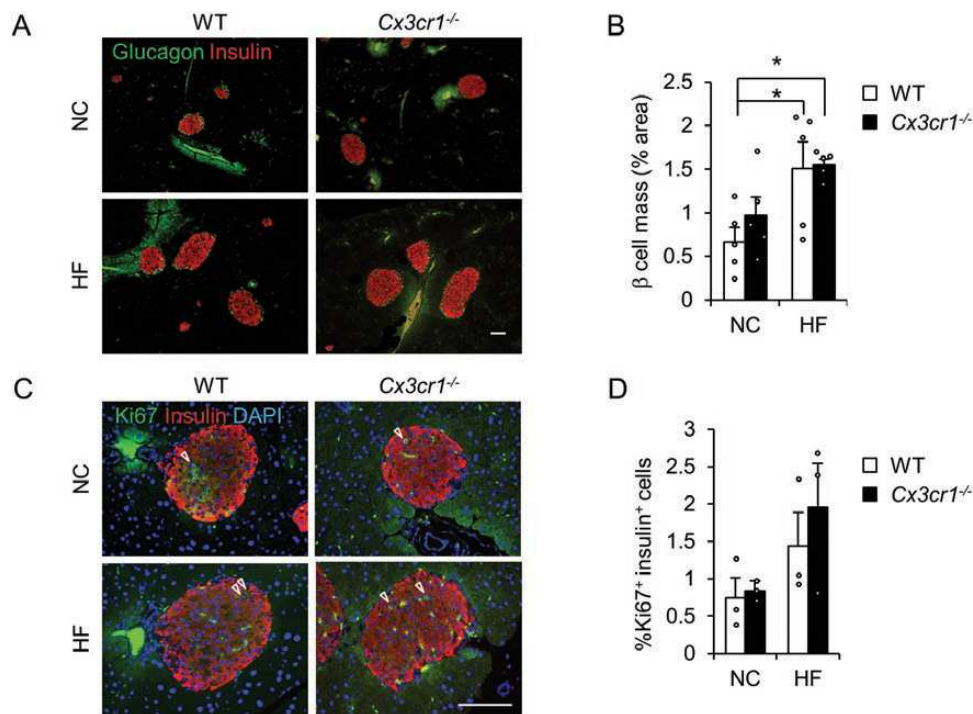


Figure 3. β cell mass and proliferation in *Cx3cr1*^{-/-} mice. (A) Immunocytochemical analysis of the islets of mice fed the NC or HF diet using anti-insulin (red) and anti-glucagon (green) antibodies. Scale bar: 100 μm. (B) β cell masses of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet ($n = 5$ per group). (C) Staining with anti-Ki67 (green) and anti-insulin (green) antibodies and 4',6-diamidino-2-phenylindole. Arrows indicate Ki67⁺ insulin⁺ cells. Scale bar: 100 μm. (D) Percentages of Ki67⁺ insulin⁺ cells in pancreatic sections of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet ($n = 3$ per group). The data in (B, D) are expressed as means ± SEM and were compared using the 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$.

in macrophages rather than adipocytes. CX3CR1 deficiency in DIO and *ob/ob* mice and in myeloid cells exacerbated adipose tissue inflammation and insulin resistance through a dynamic shift to an M1-dominant ATM phenotype. On the other hand, CCL2-CCR2 signaling deficiency in *Cx3cr1*^{-/-} mice attenuated obesity-induced inflammation and insulin resistance. Interestingly, CX3CL1 treatment improved glucose tolerance and insulin sensitivity. These results indicated that CX3CL1-CX3CR1 signaling at least partially protected against diet-induced metabolic syndrome.

In previous studies, 2 polymorphisms (V249I and T280M) of human CX3CR1 gene were shown to be associated with type 2 diabetes, metabolic syndrome, and Crohn's disease (18, 57, 58). For these polymorphisms, the binding affinity of CX3CL1 with its receptor was lower (59). Thus, CX3CL1-CX3CR1 signaling may be weakened in obese patients, contributing to the development of inflammatory diseases. However, the relationships of CX3CL1 level with the pathogenesis of obesity-induced inflammation and insulin resistance remained unclear. We showed that the plasma CX3CL1 level was negatively correlated with insulin level, and loss of CX3CL1-CX3CR1

signaling exacerbated adipose tissue inflammation and insulin resistance in both genetically (*ob/ob*) and diet-induced obese mice.

It has been reported that increased *Tnf* expression is likely to be directly related to an increase in ATM infiltration, as M1 macrophages are the primary source of TNF-α in obese adipose tissue (1, 60). Our study showed that the number of ATMs was increased in *Cx3cr1*^{-/-} mice compared with WT mice on the HF diet and caused increases in the expression of proinflammatory cytokines and chemokines, such as *Tnf* and *Ccl2*, in DIO mice. In addition, these phenomena were associated with promotion of NF-κB p65. Activation of the TNF-α receptor stimulated NF-κB signaling via inhibition of IκB kinase and led to insulin resistance in *Cx3cr1*^{-/-} mice.

We showed that *Cx3cl1* and *Cx3cr1* were predominantly expressed in macrophages rather than in adipocytes. Therefore, we next examined the significance of CX3CL1-CX3CR1 signaling in macrophages in the inflammatory response to obesity, by generating chimeric mice lacking *Cx3cr1* only in myeloid cells derived from BMT. *Cx3cr1*-deficient myeloid cells alone were sufficient to promote HF diet-induced insulin resistance and fatty liver in association

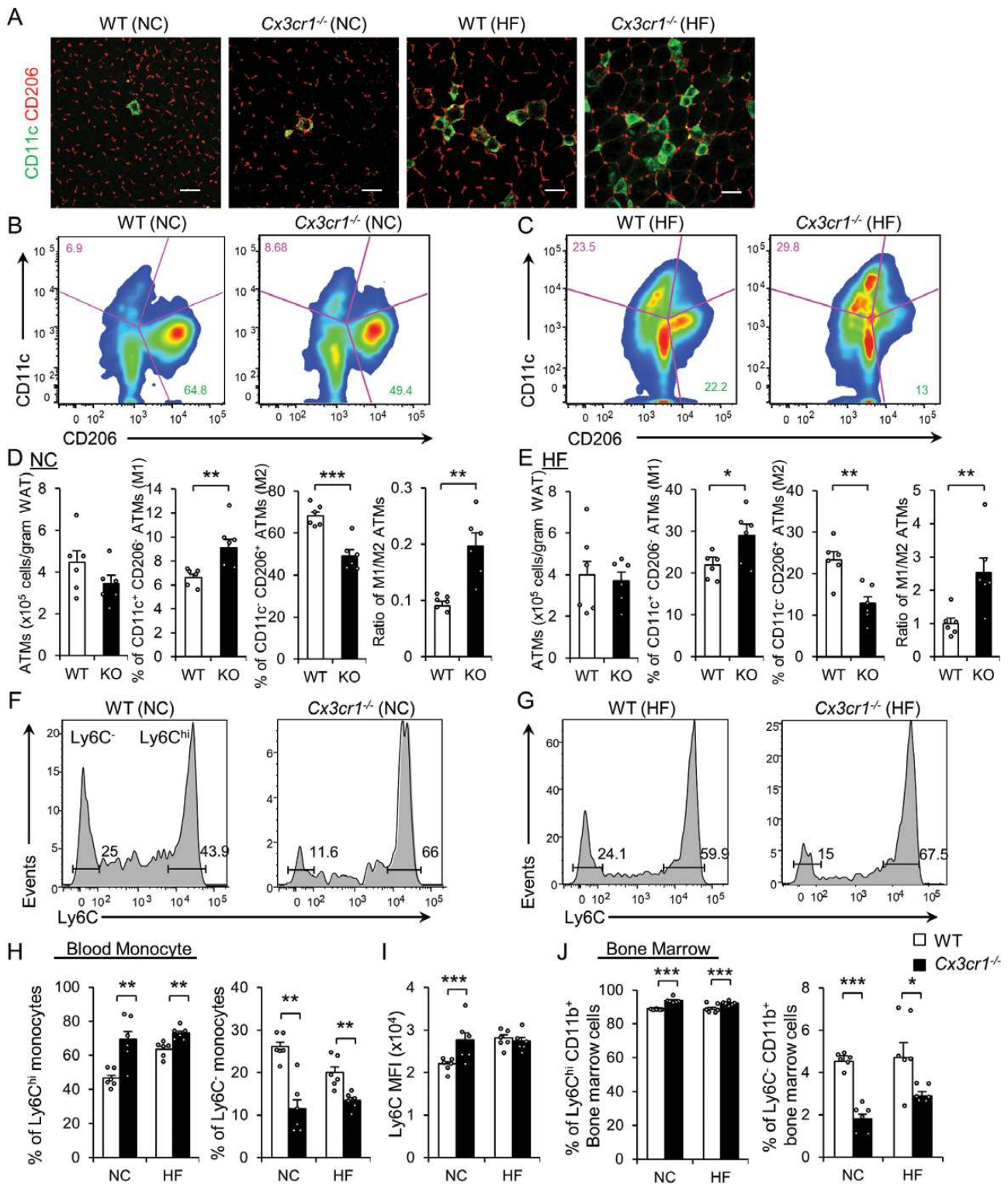


Figure 4. Increased M1-like and decreased M2-like macrophage expression in the eWAT of *Cx3cr1*^{-/-} mice. (A) Representative immunostaining images using anti-CD11c (green) and anti-CD206 (red) antibodies in the eWAT of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet at 16 weeks old. Scale bar: 100 μ m. (B, C) CD11c⁺ CD206⁻ (M1-like) and CD11c⁺ CD206⁺ (M2-like) expression patterns in the ATMs of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice fed the NC or HF diet. The representative results showed that the number of M1-like ATMs was increased, whereas the number of M2-like ATMs was decreased, in *Cx3cr1*^{-/-} mice on both diets compared with WT mice. (D and E) Quantification of total ATMs and M1- and M2-like ATMs in the eWAT of mice fed the NC diet or HF diet ($n = 6$ per group). (F and G) Representative histograms showing the blood monocyte subsets (Ly6C^{hi} and Ly6C⁻) of mice fed the NC or HF diet for 8 weeks. (H and I) Quantitative analysis of Ly6C^{hi} and Ly6C⁻ blood monocytes of NC- or HF-diet-fed mice ($n = 6$ per group). Data are percentages of Ly6C^{hi} and Ly6C⁻ blood monocytes (H) and mean fluorescence intensity (MFI) of Ly6C in blood monocytes (I). (J) Data are the percentages of Ly6C^{hi} and Ly6C⁻ bone marrow cells. (K) The mRNA expression of macrophage markers and cytokines in peritoneal macrophages ($n = 6$ per group). The data in (D, E, H-J) are expressed as means \pm SEM and were compared using the 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

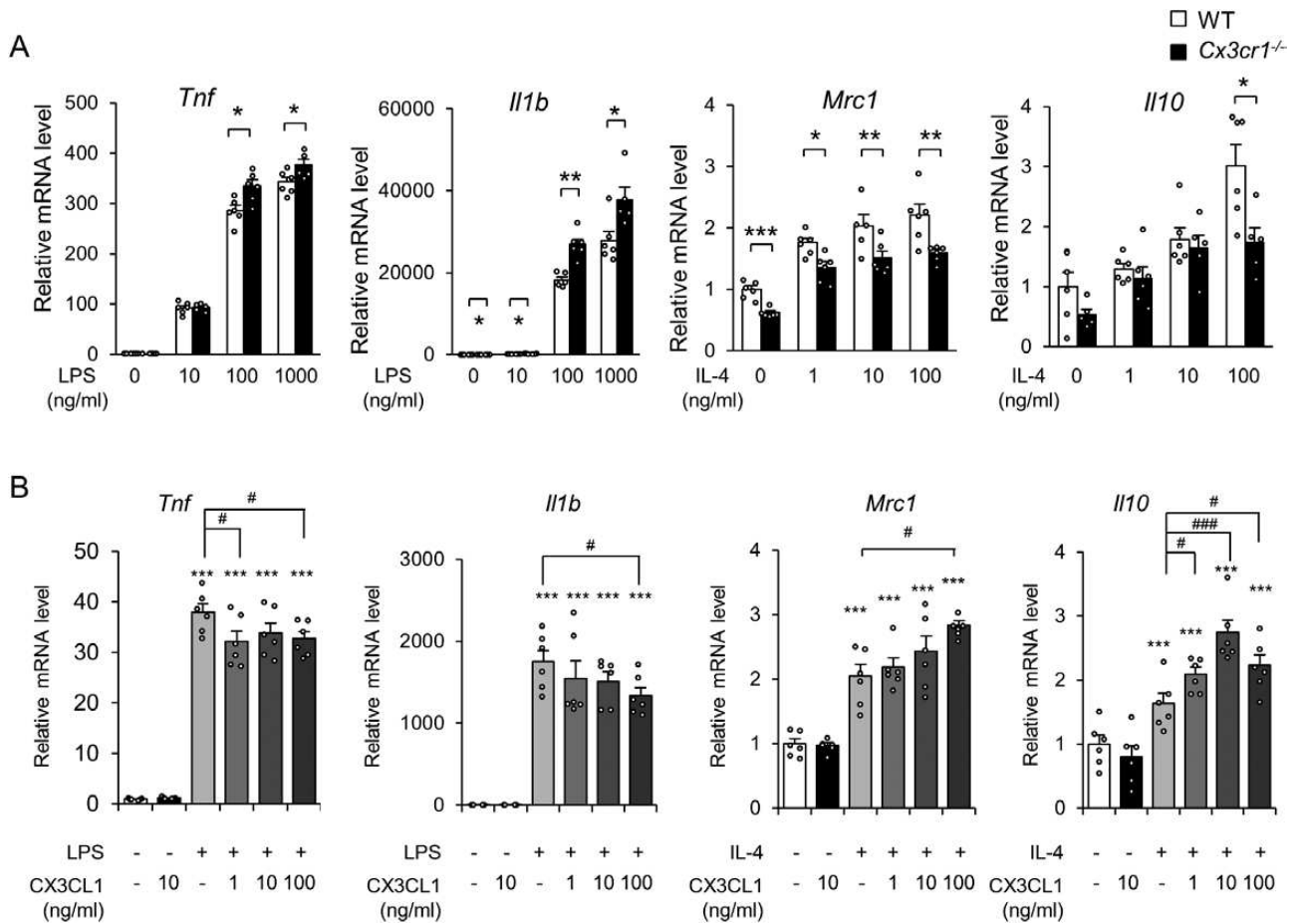


Figure 5. CX3CL1-CX3CR1 signaling suppresses LPS-induced M1 macrophage activation and enhances the expression of IL-4-induced M2 macrophage markers. (A) mRNA expression of macrophage markers and cytokines in peritoneal macrophages of WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice ($n = 6$ per group). (B) Peritoneal macrophages isolated from WT mice were co-incubated with 10 ng/mL LPS or 10 ng/mL IL-4 and 1 to 100 ng/mL Cx3cl1 for 16 h ($n = 4-6$ per treatment). The data of (A, B) are expressed as means \pm SEM and were analyzed by 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the WT or control groups. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs the LPS- or IL-4-stimulated conditions.

with an increase in M1 macrophage filtration and a decrease in M2 macrophage filtration, thus recapitulating the metabolic and pathological phenotypes in *Cx3cr1*^{-/-} mice. These observations indicated that CX3CL1-CX3CR1 signaling in myeloid cells is important in the development and maintenance of obesity-induced inflammation, fatty liver, and insulin resistance.

Recently, it was reported that the receptors *Ccr2* and *Cx3cr1* play key roles in determining the subsets of blood monocytes. *Ccr2* is expressed in Ly6C^{hi} inflammatory monocytes, which are recruited to inflamed tissues, while *Cx3cr1* is expressed in resident monocytes (CCR2⁻Ly6C⁻) in noninflamed tissues (61, 62). Furthermore, CCR2⁺Ly6C^{hi} monocyte-derived macrophages can differentiate into an M1-like phenotype and CX3CR1⁺Ly6C⁻ monocytes generated M2-like macrophages in tissue (63). On the other hand, it has been reported that, on long-term HF diet

administration, CX3CL1-CX3CR1 signaling was not associated with increased both Ly6C^{hi} and Ly6C^{low} monocytes but was required for Ly6C^{low} monocyte survival (64). Our results showed that deficiency of CX3CL1-CX3CR1 signaling consistently increased the numbers of Ly6C^{hi} monocytes and M1 macrophages and decreased the numbers of Ly6C⁻ monocytes and M2 macrophages, in mice fed either the NC or HF diet for 8 weeks. These data suggested that CX3CL1-CX3CR1 signaling might be related to the determination of monocyte and macrophage subsets in early obesity. In addition, loss of macrophage CX3CR1 expression was associated with a stronger proinflammatory and weaker anti-inflammatory phenotype in the primary culture experiments. Furthermore, CX3CL1 inhibited LPS-induced M1-like polarization and promoted IL-4-induced M2-like polarization. CX3CL1-CX3CR1 signaling may be directly involved in macrophage polarization during the

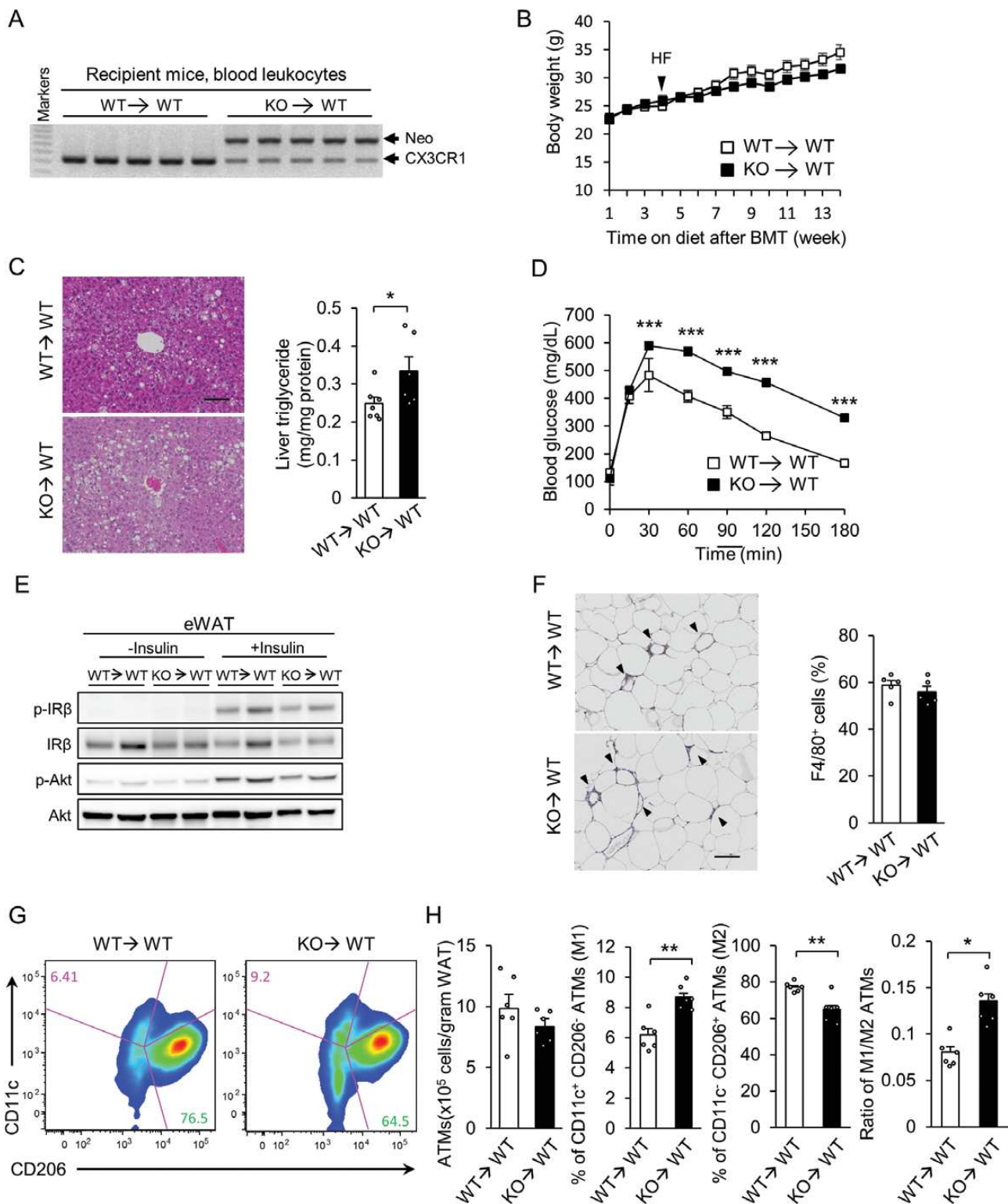


Figure 6. Chimeric mice lacking Cx3cr1 in myeloid cells show diet-induced insulin resistance, hepatic steatosis, and adipose tissue inflammation. (A) Expression of the Cx3cr1 deletion mutant *neo* gene was detected in peripheral blood leukocytes after BMT from KO to WT mice but not after BMT from WT to WT controls. (B) Weight gain of BMT recipient mice fed the HF diet for 9 weeks ($n = 6$ per group). (C) Representative images of HE stained of the liver and hepatic TG content ($n = 6$ per group). Scale bar: 100 μm . (D) GTT results of BMT mice fed the HF diet for 8 weeks ($n = 6$ per group). (E) Impaired insulin signaling in the eWAT of KO to WT mice fed the HF diet. (F) Macrophage infiltration of eWAT after KO to WT and WT to WT transplantation in mice fed an HF diet at 9 weeks, as evaluated by F4/80 immunostaining. Scale bar: 100 μm . (G) Representative results show that M1-like ATMs were increased, whereas M2-like ATMs were decreased in KO to WT mice fed the HF diet compared with WT mice. (H) Quantification of M1- and M2-like ATMs in the eWAT of mice fed the HF diet for 6 weeks ($n = 6$ per group). Data were ATM counts normalized relative to cell number and epididymal fat weight and percentages of M1- and M2-like ATMs. The data in (C, D, F, and H) are expressed as means \pm SEM and were compared using the 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

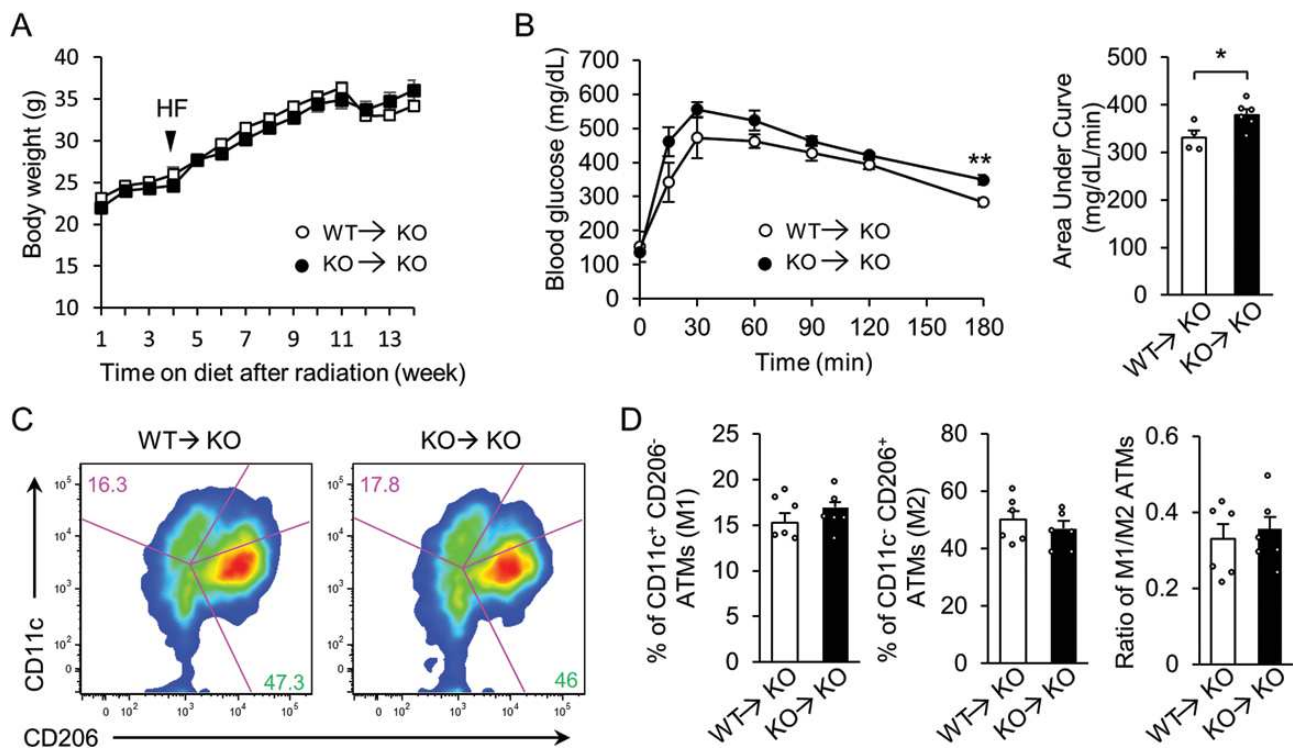


Figure 7. Phenotype of *Cx3cr1* expression myeloid cells in *Cx3cr1*^{-/-} mice. (A) Weight gains of the WT to KO and KO to KO mice fed an HF diet for 10 weeks after BMT (n = 6 per group). (B) GTT results for BMT mice fed an HF diet for 8 weeks (n = 4-6 per group). (C) Representative plots revealing M1- and M2-like ATMs in KO to KO mice and WT to KO mice. (D) Quantitation of M1- and M2-like ATMs in the WAT of mice fed the HF diet for 6 weeks (n = 6 per group). The data are the percentages of M1- and M2-like ATMs. The data in (B) are expressed as means ± SEM and were analyzed by 2-tailed Student's *t*-test; **P* < 0.05.

development of obesity. On the other hand, CCL2-CCR2 signaling deficit in *Cx3cr1*^{-/-} mice was shown to decrease the numbers of M1 macrophages and increase the numbers of M2 macrophages compared with *Cx3cr1*^{-/-} mice on the HF diet, thereby enhancing insulin sensitivity in *Ccl2* and *Cx3cr1* DKO mice. Thus, CX3CL1-CX3CR1 signaling and CCL2-CCR2 signaling may independently regulate M1/M2 polarization and contribute reciprocally to obesity-induced inflammation and insulin resistance. It will be interesting to more thoroughly explore whether the *Cx3cl1* axis is further connected to *Ccl2*.

Our data demonstrated that in vivo overexpression of *Cx3cl1* attenuated glucose-intolerance and enhanced insulin-sensitivity in both the liver and eWAT of DIO mice. Furthermore, the levels of proinflammatory cytokines were downregulated in the liver but not in eWAT. This phenomenon occurred only in the liver because hydrodynamic tail vein injection induces the expression of exogenous proteins in hepatocytes (65). Although hepatic steatosis was unaffected by *Cx3cl1* treatment in our study, prolonged exposure to *Cx3cl1* (28 days) may exert some protective effects. However, an increase in the plasma *Cx3cl1* level had no effect on insulin sensitivity in *Cx3cr1*^{-/-} mice, suggesting

that the protective effect of *Cx3cl1* was mediated by its receptor. Therefore, the CX3CL1-CX3CR1 signaling may be a target for the treatment of obesity and type 2 diabetes.

CX3CL1-CX3CR1 signaling plays a role in glycemic control by regulating insulin secretion in the context of β cell function, and *Cx3cl1* treatment reverses β cell abnormalities (20, 66). Our study showed that β cell mass increased in mice on the HF diet compared with the NC diet but did not differ according to genotype or with *Cx3cl1* overexpression. Moreover, CX3CL1-CX3CR1 signaling had no effect on β cell proliferation. While hyperinsulinemia was attenuated by *Cx3cl1*, our data indicated that the functional profile of *Cx3cl1* may be related to improved insulin sensitivity, rather than the regulation of β cell secretory function. Furthermore, CX3CL1-CX3CR1 signaling in female mice positively regulates the metabolic phenotype via hypothalamic microglial activation (21). As we used male mice in the present study, microglial *Cx3cr1* signaling would have had no effect on metabolic phenotype. We plan to perform a detailed analysis of hypothalamic microglial activation in *Cx3cr1*^{-/-} male mice.

In summary, our findings suggested that CX3CL1-CX3CR1 signaling plays a critical role in obesity-induced

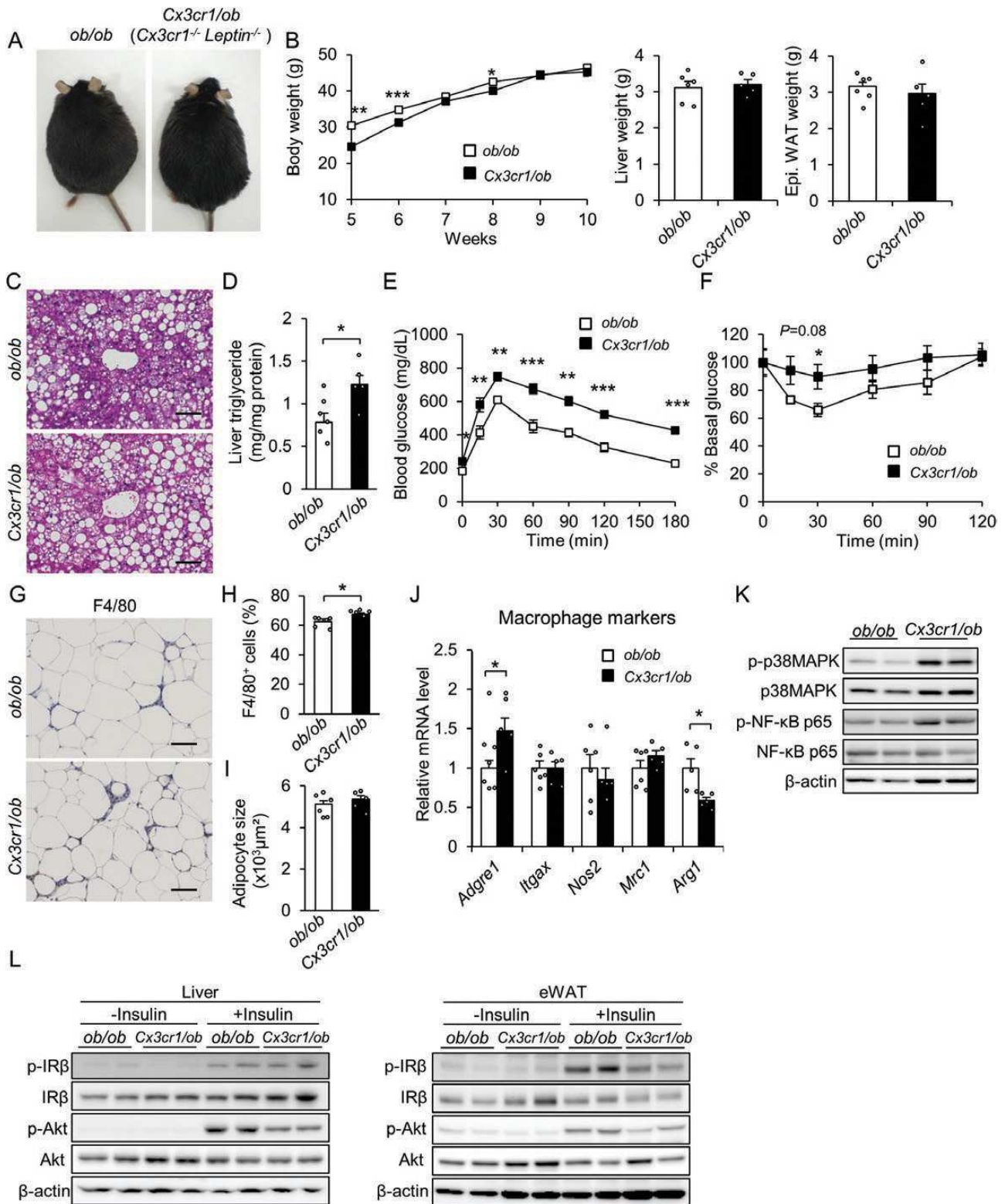


Figure 8. *Cx3cr1* deficiency in *ob/ob* mice promotes insulin resistance, hepatic steatosis, and adipose tissue inflammation. (A) Generation of *Cx3cr1/ob* (*Cx3cr1^{-/-} Leptin^{-/-}*) mice. (B) Weight gain of control (*ob/ob*) and *Cx3cr1/ob* mice ($n = 5-6$ per group) at 10 weeks old. (C) Representative images of HE-stained slides of the liver. Scale bar: 100 μm. (D) Hepatic TG content ($n = 5-6$ per group). (E) GTT ($n = 5-6$ per group). (F) Plasma insulin levels of *ob/ob* and *Cx3cr1/ob* mice in the fasted or fed state ($n = 5-6$ per group). (G) Macrophage infiltration in the eWAT of *ob/ob* and *Cx3cr1/ob* mice at 10 weeks old as evaluated by F4/80 immunostaining. Scale bar: 100 μm. (H) Ratio of F4/80-positive cells to total cells counted in the eWAT ($n = 3-4$ per group). (I) Adipocyte size of *ob/ob* and *Cx3cr1/ob* mice ($n = 3-4$ per group). (J) mRNA expression of macrophage markers in eWAT from *ob/ob* and *Cx3cr1/ob* mice ($n = 5-6$ per group). (K) Exacerbation of inflammatory signaling in the eWAT of *Cx3cr1/ob* mice. Immunoblotting analysis of p-p38MAPK, p-NF-κB p65, and their total proteins in eWAT. (L) Impaired insulin signaling in the liver and eWAT of *Cx3cr1/ob* mice. Immunoblots of phospho-Tyr1146 insulin receptor β subunit (p-IRβ), IRβ, phospho-Ser473 Akt (p-Akt), and Akt in the liver and eWAT of *ob/ob* or *Cx3cr1/ob* mice. The data of (D-F, H, and J) are expressed as means ± SEM and were compared using the 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

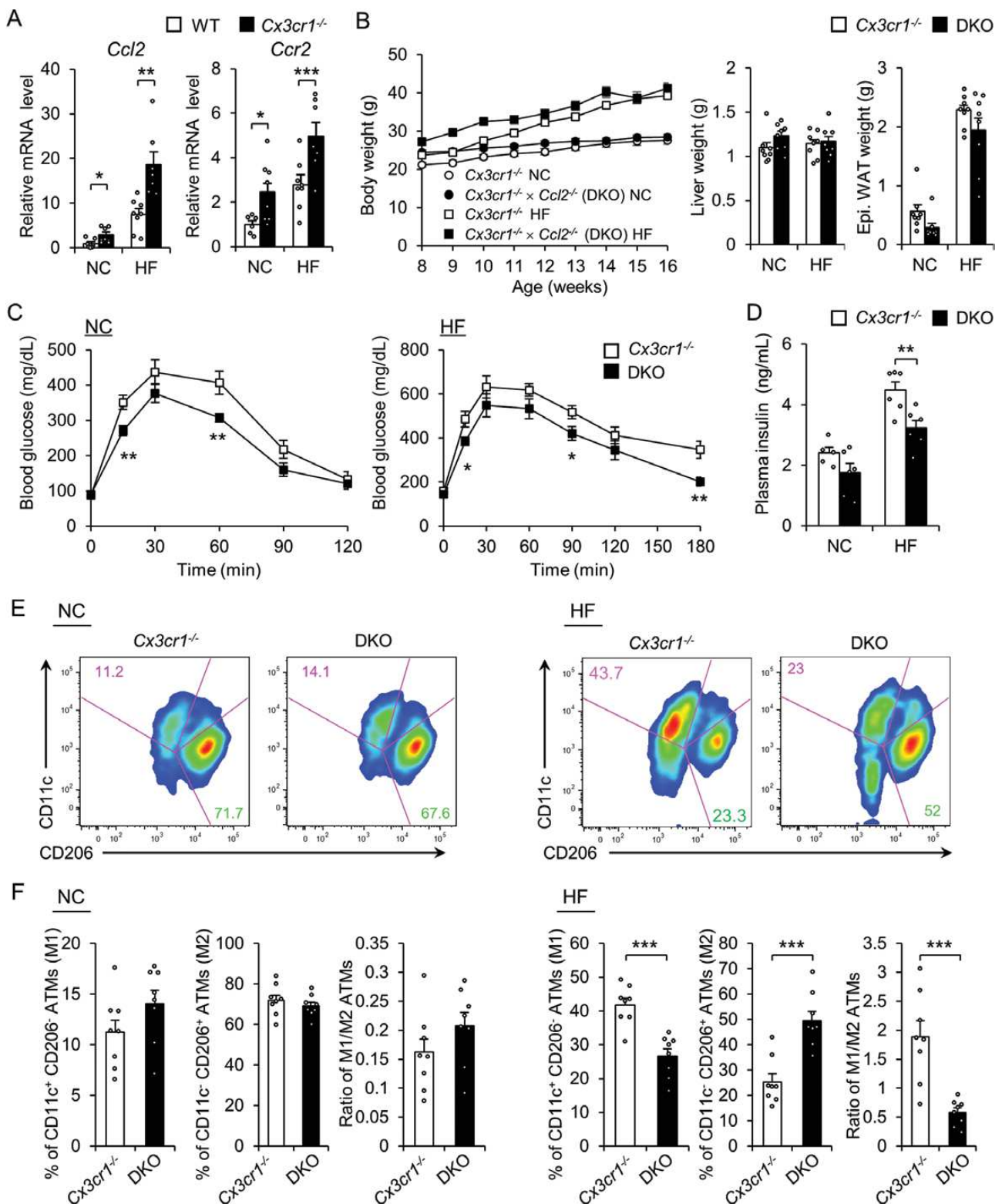


Figure 9. *Ccl2* deficiency in *Cx3cr1*^{-/-} mice attenuates insulin resistance and adipose inflammation via a significant reduction in the M1/M2 ratio. (A) mRNA expression of *Ccl2* and *Ccr2* in eWAT from mice fed the NC or HF diet. Data were obtained from 20-week-old fasted *Cx3cr1*^{-/-} mice and WT littermate controls ($n=6-8$ per group). (B) The body and tissue weights of *Cx3cr1*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} × *Ccl2*^{-/-} (DKO) mice fed the NC or HF diet for 16 weeks ($n=8$ per group). (C) GTT ($n=5-6$ per group). (D) Plasma insulin levels in the fed state ($n=5-6$ per group). (E) Representative results showing that M1-like ATMs were decreased, whereas M2-like ATMs were increased in DKO mice fed the HF diet compared with *Cx3cr1*^{-/-} mice. (F) Quantification of M1- and M2-like ATMs in the eWAT of mice fed the NC diet or HF diet for 16 weeks ($n=8$ per group). Data are percentages of M1- and M2-like ATMs. Data in (A, C, D, and F) are expressed as means \pm SEM and were analyzed by 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

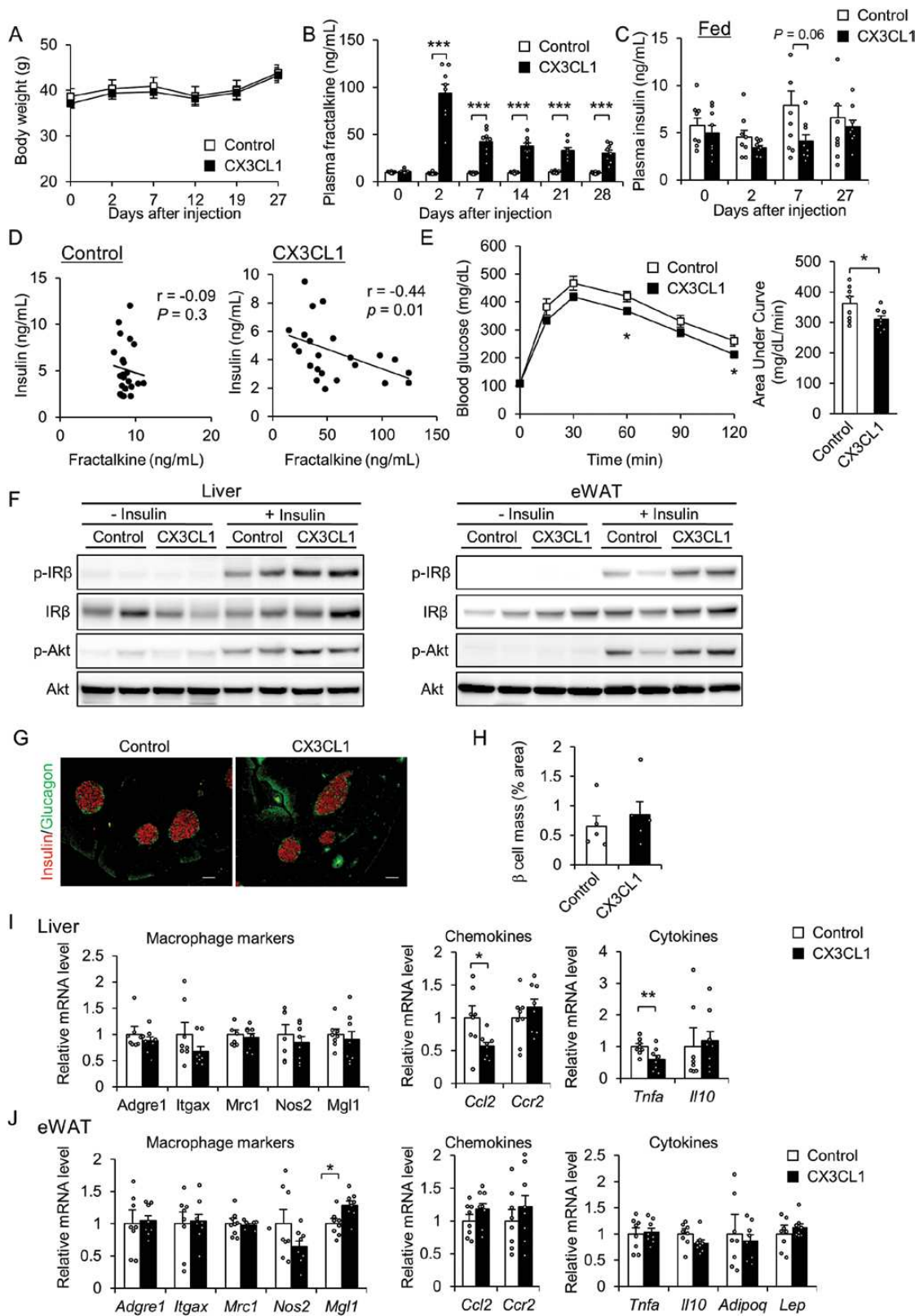


Figure 10. Cx3cl1 treatment enhances diet-induced insulin sensitivity. (A) Weight gain of DIO-WT mice after hydrodynamic injection of pLIVE empty vector (control) or pLIVE-CX3CL1 from 0 to 27 days ($n = 8$ per group). (B) Time course of changes in Cx3cl1 expression in plasma after hydrodynamic injection ($n = 8$ per group). (C) Time course of changes in plasma insulin levels after hydrodynamic injection ($n = 8$ per group). (D) Correlation of plasma insulin with Cx3cl1 after hydrodynamic injection of control or Cx3cl1 ($n = 24-26$). (E) GTT results of DIO-WT mice after 14 days with hydrodynamic injection of control or Cx3cl1 ($n = 8$ per group). (F) Enhanced insulin signaling in the liver and eWAT after hydrodynamic injection of Cx3cl1.

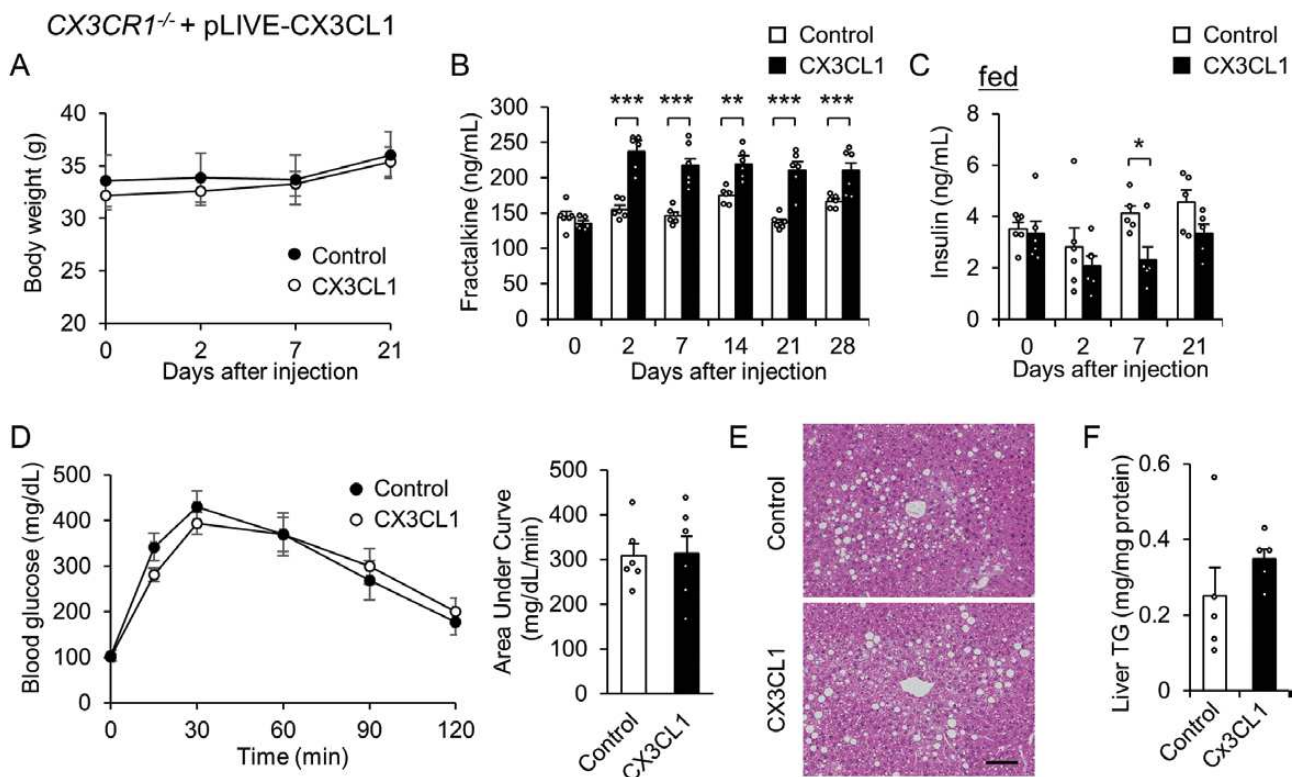


Figure 11. Cx3cl1 treatment has no effect on diet-induced insulin resistance in *Cx3cr1*^{-/-} mice. (A) The weight gain of *Cx3cr1*^{-/-} mice after hydrodynamic injection of the pLIVE empty vector (control) or pLIVE-CX3CL1 vector (CX3CL1) from days 0 to 21 ($n = 6$ per group). (B) The time course of Cx3cl1 expression in plasma after hydrodynamic injection ($n = 6$ per group). (C) The time course of the plasma insulin level after hydrodynamic injection ($n = 5-6$ per group). (D) GTT results after 14 days of hydrodynamic injection of the control or Cx3cl1 ($n = 6$ per group). (E) Representative images of HE-stained liver slices. Scale bar: 100 μm . (F) Hepatic TG content ($n = 5$ per group). Data in (B and C) are expressed as means \pm SEM and were analyzed by 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

inflammation and insulin resistance by regulating the M1/M2 status of macrophages. Loss of CX3CL1-CX3CR1 signaling results in macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype, thereby negatively regulating obesity-induced insulin resistance, diabetes, and nonalcoholic fatty liver disease. Overall, our study highlighted the potential clinical utility of the CX3CL1-CX3CR1 system for improving type 2 diabetes.

Acknowledgments

The authors thank M. Nakayama and K. Hara (Kanazawa University, Japan) for technical assistance and animal care.

Financial Support: This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from MEXT, Japan (grant number 19K11764).

Figure 10: continued

Immunoblots of phospho-Tyr1146 insulin receptor β subunit (p-IR β), IR β , phospho-Ser473 Akt (p-Akt), and Akt. (G) Immunocytochemical analysis in the islets of control or CX3CL1 mice using anti-insulin (red) and antiglucagon (green) antibodies. Scale bar: 100 μm . (H) β cell masses in control and CX3CL1 mice. Means \pm SEM ($n = 5$ per group). (I and J) mRNA expression of macrophage markers, chemokines, and cytokines in the liver and eWAT after hydrodynamic injection of control or CX3CL1 ($n = 8$ per group). The data of (B, C, E, and H-J) are expressed as means \pm SEM and were compared using the 2-tailed Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Author Contributions: MN conceived the study and wrote the manuscript; MN, KS, YN, NN, and LX performed experiments and collected and analyzed data; MK performed DNA microarray analysis; NM provided *Cx3cr1* knockout mice and *CCL2* knockout mice; KS, YN, TO, TY, and SK contributed to discussions and edited the manuscript; and MN supervised and delivered the project and acquired funding. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Correspondence: Mayumi Nagashimada, PhD, Assistant Professor, Division of Health Sciences, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa, 920-0942, Japan. E-mail: nakanaga@staff.kanazawa-u.ac.jp.

Disclosures: The authors have nothing to disclose and no potential conflicts of interest relevant to this article to report.

Data Availability: All data generated or analyzed during this study are included in this published article or in the data repositories listed in references.

References

1. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821-1830.
2. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-867.
3. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494-1505.
4. Ota T. Chemokine systems link obesity to insulin resistance. *Diabetes Metab J.* 2013;37(3):165-172.
5. Kitade H, Sawamoto K, Nagashimada M, et al. CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes.* 2012;61(7):1680-1690.
6. Ota T. CCR5: A novel player in the adipose tissue inflammation and insulin resistance? *Adipocyte.* 2013;2(2):99-103.
7. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91(4):521-530.
8. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood.* 2009;113(4):963-972.
9. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188(8):1413-1419.
10. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(11):1897-1908.
11. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 2007;117(1):185-194.
12. Combadière C, Potteaux S, Gao JL, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation.* 2003;107(7):1009-1016.
13. Apostolakis S, Spandidos D. Chemokines and atherosclerosis: focus on the CX3CL1/CX3CR1 pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(10):1251-1256.
14. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1241-1250.
15. Nanki T, Imai T, Nagasaka K, et al. Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(11):2878-2883.
16. Ruth JH, Volin MV, Haines GK 3rd, et al. Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(7):1568-1581.
17. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2(1):1.
18. Leonardi I, Li X, Semon A, et al. CX3CR1+ mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. *Science.* 2018;359(6372):232-236.
19. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, et al. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4787-4795.
20. Lee YS, Morinaga H, Kim JJ, et al. The fractalkine/CX3CR1 system regulates β cell function and insulin secretion. *Cell.* 2013;153(2):413-425.
21. Dorfman MD, Krull JE, Douglass JD, et al. Sex differences in microglial CX3CR1 signalling determine obesity susceptibility in mice. *Nat Commun.* 2017;8:14556.
22. Ishida Y, Kuninaka Y, Yamamoto Y, et al. Pivotal involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis for the recruitment of M2 tumor-associated macrophages in skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2020;140(10):1951-1961.e6.
23. Lu P, Li L, Kuno K, et al. Protective roles of the fractalkine/CX3CL1-CX3CR1 interactions in alkali-induced corneal neovascularization through enhanced antiangiogenic factor expression. *J Immunol.* 2008;180(6):4283-4291.
24. Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, et al. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: a comparison with vitamin E. *Sci Rep.* 2015;5:17192.
25. Ni Y, Nagashimada M, Zhan L, et al. Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid, β -cryptoxanthin. *Endocrinology.* 2015;156(3):987-999.
26. RRID:AB_2811268. http://antibodyregistry.org/AB_2811268
27. RRID:AB_2890095. http://antibodyregistry.org/AB_2890095
28. RRID:AB_2575663. http://antibodyregistry.org/AB_2575663
29. RRID:AB_331641. http://antibodyregistry.org/AB_331641
30. RRID:AB_330713. http://antibodyregistry.org/AB_330713
31. RRID:AB_331284. https://scicrunch.org/resolver/AB_331284
32. RRID:AB_330561. https://scicrunch.org/resolver/AB_330561
33. RRID:AB_331578. https://scicrunch.org/resolver/AB_331578
34. RRID:AB_2280448. https://scicrunch.org/resolver/AB_2280448
35. RRID:AB_329825. https://scicrunch.org/resolver/AB_329825
36. RRID:AB_329827. https://scicrunch.org/resolver/AB_329827
37. RRID:AB_476744. https://scicrunch.org/resolver/AB_476744
38. RRID:AB_1140040. http://antibodyregistry.org/AB_1140040
39. RRID:AB_306130. http://antibodyregistry.org/AB_306130
40. RRID:AB_259852. http://antibodyregistry.org/AB_259852
41. RRID:AB_443209. http://antibodyregistry.org/AB_443209
42. 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.* 2008;57(12):3239-3246.
43. RRID:AB_306203. http://antibodyregistry.org/AB_306203
44. RRID:AB_10891146. http://antibodyregistry.org/AB_10891146
45. RRID:AB_322613. http://antibodyregistry.org/AB_322613
46. RRID:AB_324695. http://antibodyregistry.org/AB_324695
47. RRID:AB_1288416. http://antibodyregistry.org/AB_1288416
48. RRID:AB_2313584. http://antibodyregistry.org/AB_2313584
49. RRID:AB_138404. http://antibodyregistry.org/AB_138404
50. RRID:AB_2338997. http://antibodyregistry.org/AB_2338997
51. RRID:AB_10561522. http://antibodyregistry.org/AB_10561522
52. RRID:AB_2338999. http://antibodyregistry.org/AB_2338999
53. RRID:AB_2340474. http://antibodyregistry.org/AB_2340474
54. Zhuge F, Ni Y, Nagashimada M, et al. DPP-4 inhibition by linagliptin attenuates obesity-related inflammation and insulin

- resistance by regulating M1/M2 macrophage polarization. *Diabetes*. 2016;**65**(10):2966-2979.
55. Cho KW, Morris DL, Lumeng CN. Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages. *Methods Enzymol*. 2014;**537**:297-314.
56. Sasaki S, Baba T, Shinagawa K, Matsushima K, Mukaida N. Crucial involvement of the CCL3-CCR5 axis-mediated fibroblast accumulation in colitis-associated carcinogenesis in mice. *Int J Cancer*. 2014;**135**(6):1297-1306.
57. Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, et al. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011;**60**(5):1512-1518.
58. Sirois-Gagnon D, Chamberland A, Perron S, Brisson D, Gaudet D, Laprise C. Association of common polymorphisms in the fractalkine receptor (CX3CR1) with obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;**19**(1):222-227.
59. Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. 2000;**287**(5461):2274-2277.
60. 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*. 2003;**112**(12):1796-1808.
61. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;**19**(1):71-82.
62. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol*. 2008;**86**(5):398-408.
63. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*. 2014;**5**:514.
64. Morris DL, Oatmen KE, Wang T, DelProposto JL, Lumeng CN. CX3CR1 deficiency does not influence trafficking of adipose tissue macrophages in mice with diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;**20**(6):1189-1199.
65. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*. 1999;**6**(7):1258-1266.
66. Riopel M, Seo JB, Bandyopadhyay GK, et al. Chronic fractalkine administration improves glucose tolerance and pancreatic endocrine function. *J Clin Invest*. 2018;**128**(4):1458-1470.