

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09889

研究課題名(和文)新規治療法の開発を目指した糖・脂質代謝における免疫プロテアソームの役割の解明

研究課題名(英文) Study of the role of the immunoproteasome in glucose- or lipid-metabolism

研究代表者

木村 博昭 (KIMURA, HIROAKI)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：70593622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫プロテアソームは、免疫において重要な役割を担う分子で、主に免疫細胞に多く発現しているが、実は多様な細胞に発現しており、糖・脂質代謝調節にも役割があることを見出し、その役割について解明を試みた。酵素サブユニットのLMP7発現キメラマウスの利用により、耐糖能とインスリン感受性には、組織細胞のLMP7の欠損が重要で、どちらも改善することがわかった。特に、脂肪組織でのインスリン感受性が良かった。脂肪細胞の分化について検討したところ、LMP7の欠損や、阻害剤による抑制により、分化が抑制され、分化初期にPPAR-gやC/EBPaの発現が抑制されることによって、分化が抑制されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、免疫プロテアソームの役割について研究を進めている。研究者の多くは、血球・免疫細胞における役割に着目しており、組織細胞におけるその役割についてはほとんど解明されていない。したがって、本研究において、組織細胞における免疫プロテアソームの役割を解明することは、免疫プロテアソームの新規の役割を見出すという点において、学術的に意義があると言える。また、我が国では高齢化が進み、生活習慣病である糖尿病の患者数も多く、血糖値をコントロールする新規の糖尿病治療薬が、本研究を基に開発されれば、本研究は社会的に意義があると言える。

研究成果の概要(英文)：It is very important to improve QOL (Quality of Life), which often is influenced by metabolic disorders and aging. Despite the fact that many medications on metabolic disorders or aging have been developed, it is always preferable to develop new types of medications for such diseases.

The immunoproteasome is known as an immune modulator and involved in the pathogenesis of autoimmune diseases. We found that deficiency of LMP7 (an enzymatic subunit of the immunoproteasome) improves glucose tolerance and insulin sensitivity. Interestingly, LMP7 in non-immune cells plays an important role in glucose tolerance and insulin sensitivity. We also found that LMP7 deficiency increases IRS-1 in adipose tissue. In addition, both inhibition and depletion of LMP7 suppressed adipogenesis in mouse preadipocyte cell line, 3T3-L1 cells. Decrease of PPAR-g and C/EBPa was involved in the suppression of adipogenesis.

研究分野：免疫学・内分泌学・薬学

キーワード：免疫プロテアソーム 糖代謝 脂肪細胞分化 マクロファージ LMP7

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖・脂質代謝異常は、肥満などのメタボリック症候群で起こり、近年、先進国だけでなく新興国でも患者数が顕著に増加している。これらの生活習慣病の治療薬には、様々な種類があり、代謝調節を標的とした治療薬が多く開発されているが、それらと作用機序の異なる新薬の開発も望まれている。最近の研究により、肥満などのメタボリック症候群の糖・脂質代謝異常と炎症が密接に関連するという報告が顕著に増加している。しかし、炎症が糖・脂質代謝異常にどの様に関わっているかは未知の点が多く、この機序を解明することによって、新規の治療薬開発が期待される。

(2) 申請者は、米国留学時に内分泌器官の甲状腺病態の一つである慢性甲状腺炎のマウスモデルを利用し、免疫プロテアソームが甲状腺機能の低下に重要な役割を担っていることを見出した。帰国後、免疫プロテアソームの欠損が高脂肪食投与による肥満・糖代謝異常・脂質異常(脂肪組織中)炎症を抑制することを報告した。これらの病態の改善には、マクロファージの浸潤・炎症の抑制が関与していることから、「慢性炎症」と「マクロファージ浸潤」という2点と「糖・脂質代謝異常」に免疫プロテアソームがどのように関わっているかを解析することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は糖・脂質代謝異常における免疫プロテアソームの役割を解明し、生活習慣病の予防法や治療法を開発することである。研究目的を下記にリストアップした。

1. LMP7欠損により糖・脂質代謝が改善される要因細胞(血球系か非血球系細胞)の同定
2. 臓器における糖輸送分子(GLUTやSGLT)の発現系へのLMP7の関与
3. 脂肪細胞分化過程におけるLMP7の役割(MS:質量分析による分化関連分子の同定を含む)
4. マウスでのLMP7選択的阻害剤投与による糖代謝改善効果(治療法開発)
5. LMP2(LMP7以外の免疫プロテアソーム分子)欠損マウスでも代謝が改善されるか

これらの検討により、糖・脂質代謝異常における免疫プロテアソームの役割の解明と新規治療法開発を目指した。

3. 研究の方法

キメラマウスを作製し(右図参照)糖代謝・脂質代謝の検討を筆頭に以下の実験を行った。

- ・ 骨髄移植キメラマウスモデルを作製し、糖負荷・インスリン負荷試験を行った。
- ・ 血糖値を制御しうる臓器(膵臓・肝臓・腎臓・筋肉・脂肪)におけるLMP7の役割を分子レベルで解析した。
- ・ 野生型マウスの各臓器におけるLMP7の発現量を検討した。
- ・ 糖代謝に関わるインスリン・グルカゴン(膵臓)、糖の再吸収に関わるSGLT2(腎臓)、その他、筋肉・脂肪や肝臓など複数の臓器でGLUT系(グルコーストランスポーター系)遺伝子の発現をreal-time PCRで測定し、野生型とLMP7欠損マウスでの発現差を比較した。

LMP7阻害やノックダウンで影響される分子の遺伝子改変3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化能や脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を解析した。

抗炎症性マクロファージのM2マクロファージが脂肪組織に多いことを見出し、骨髄細胞からマクロファージ分化させた細胞を、IL-4で刺激し、さらにM2マクロファージに分化させ、LMP7欠損の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) LMP7(免疫プロテアソームの酵素サブユニットの一つ)の全身欠損マウスにおいて、耐糖能とインスリン感受性の改善がみられたことから(2015年Scientific Reports, 15883)炎症

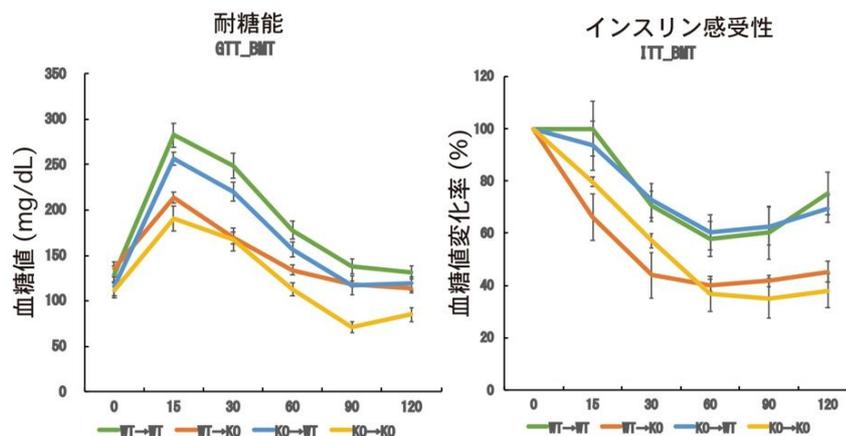
図 骨髄移植キメラマウスの実験より解明されるLMP7の役割

骨髄移植によるキメラマウスの状態



に關する血球系における LMP7 の欠損と組織側(非血球系)の LMP7 の欠損のどちらがその改善効果において優位であるかを検討するために、上記のキメラマウスに "LMP7KO to LMP7KO" も追加して作製し、耐糖能とインスリン感受性を検討し、次の図のデータを得た。レシピエントが LMP7KO の場合、すなわち、非血球

図 キメラマウスを利用した耐糖能・インスリン感受性テスト

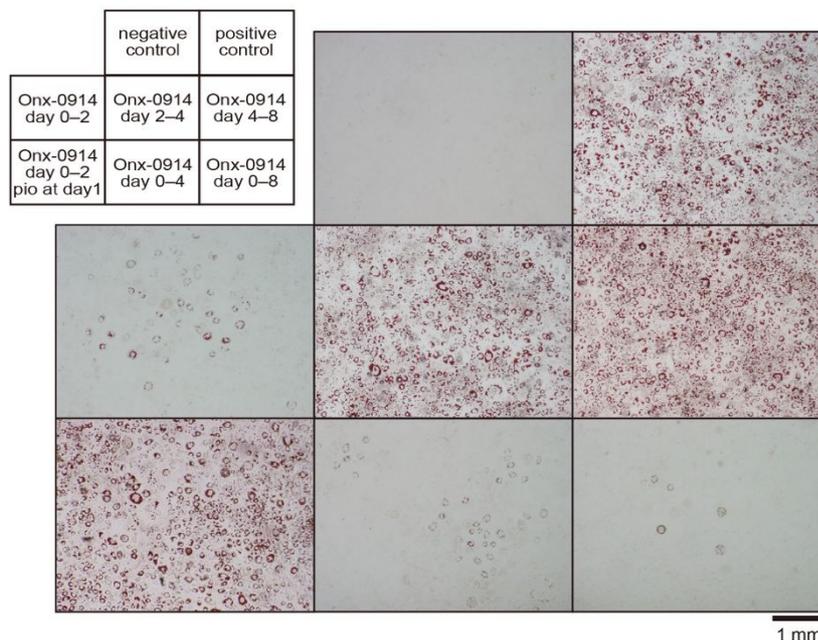


系の細胞の LMP7 が欠損しているマウスにおいて、耐糖能とインスリン感受性の両方が改善された。このデータから、糖代謝に免疫プロテアソームの酵素サブユニットである LMP7 が何らかの役割を担っていることと、特に非血球系の組織細胞における LMP7 の働きが糖代謝において重要で、この LMP7 の活性を抑制すると糖代謝の改善がみられる可能性を示している。組織の遺伝子発現解析を行い、筋肉では、Glut4 (糖の取り込みに関与) の発現が、内臓脂肪組織では、Irs1 (インスリン感受性に関与) の発現が亢進していることを見出し、LMP7 が、それらの組織における糖代謝の感受性に関わっていることが示唆された。株化細胞等を利用して、タンパク質レベルでの制御機構を検討し、投稿準備中の状態である。

(2) 脂肪細胞の分化において、LMP7 の欠損や阻害によって、その分化が抑制されることがわかった。その分化抑制において、分化のどの時期に影響を及ぼすのかを調査するために、LMP7 の選択的阻害剤である Onx-0914 を分化の時期を分けて投与したところ、図のように、分化刺激を始めた最初の 2 日間に影響を及ぼすことがわかった。分化に関する転写因子の遺伝子発現とタンパク質発現を検討したところ、PPAR-gamma と C/EBP-alpha の発現が顕著に抑制されていた。

そこで、PPAR-gamma のアゴニストである pioglitazone を day1 に追加すると、脂肪細胞の分化が回復した。さらに PPAR-gamma の転写調節因子を標的にし、その発現を調査し、分化の抑制に影響を及ぼす候補因子の発現系を作製した。その分化抑制に対する候補分子を強制発現することにより、ある程度脂肪細胞の分化が回復することを見出した。その効果をまとめて論文を作成し、投稿しているところである。

図 3T3-L1 細胞の分化と、Onx-0914(LMP7 阻害剤)による分化抑制と pioglitazone による分化の回復



(3) LMP7 欠損マウスでは、免疫が抑制傾向にあり、脂肪組織や肺組織において、M2 マクロファージが増加していることがわかった。そこで、骨髓細胞からマクロファージを作製し、M2 マクロファージへ分化させるために IL-4 で刺激し、M2 マクロファージ特異的な分子マーカーの発現を遺伝子とタンパク質レベルで検討した。特に CD206 や arginase-1 の発現が増強されており、その分化制御機構についても解析を始めた。IL-4 の受容体や、シグナル伝達分子の発現を中心に検討し、発現が減弱している候補因子を見出した。その候補因子の強制発現系を作製し、その効果について検討している。(未発表)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 7) Ito H, Sadatomo A, Inoue Y, Yamada N, Aizawa E, Hishida E, Kamata R, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Komada T, Horie H, Kitagawa J, Sata N, Takahashi M	4. 巻 519
2. 論文標題 Role of TLR5 in inflammation and tissue damage after intestinal ischemia-reperfusion injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.08.083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 6) Hishida E, Ito H, Komada T, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Kamata R, Aizawa E, Kasahara T, Morishita Y, Akimoto T, Nagata D, Takahashi M	4. 巻 9
2. 論文標題 Crucial role of NLRP3 inflammasome in the development of peritoneal dialysis-related peritoneal fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46504-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 5) Mizushima Y, Karasawa T, Aizawa K, Kimura H, Watanabe S, Kamata R, Komada T, Mato N, Kasahara T, Koyama S, Bando M, Hagiwara K, Takahashi M	4. 巻 203
2. 論文標題 Inflammasome-independent and atypical processing of IL-1 contributes to acid aspiration-induced acute lung injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunol	6. 最初と最後の頁 236-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 4) Anzai F, Watanabe S, Kimura H, Kamata R, Karasawa T, Komada T, Nakamura J, Nagi-Miura N, Ohno N, Takeishi Y, Takahashi M	4. 巻 138
2. 論文標題 Crucial role of NLRP3 inflammasome in a murine model of Kawasaki disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol	6. 最初と最後の頁 185-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2019.11.158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2)Yamada N, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Komada T, Kamata R, Sampilvanjil A, Ito J, Nakagawa K, Kuwata H, Hara S, Sakuma Y, Sata N, Takahashi M	4. 巻 11
2. 論文標題 Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2334-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 3)Yamada N, Karasawa T, Wakiya T, Sadatomo A, Ito H, Kamata R, Watanabe S, Komada T, Kimura H, Sanada Y, Sakuma Y, Mizuta K, Sata N, Takahashi M	4. 巻 20
2. 論文標題 Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplantation: potential role of ferroptosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Transplant	6. 最初と最後の頁 1606-1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.15773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 1)Watanabe S, Usui-Kawanishi F, Karasawa, Kimura H, Kamata R, Inoue, Mise N, Kasahara T, Takahashi M	4. 巻 235
2. 論文標題 Glucose regulates hypoxia-induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 7554-7566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunoproteasome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLS	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/9780470015902.a0026244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura J, Watanabe S, Kimura H, Kobayashi M, Karasawa T, Kamata R, Usui-Kawanishi F, Sadatomo A, Mizukami H, Nagi-Miura N, Ohno N, Kasahara T, Minota S, Takahashi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Adeno-associated Virus Vector-mediated Interleukin-10 Induction Prevents Vascular Inflammation in a Murine Model of Kawasaki Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25856-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Motoi, Usui-Kawanishi Fumitake, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Mise Nathan, Kayama Fujio, Kasahara Tadashi, Hasebe Naoyuki, Takahashi Masafumi	4. 巻 12
2. 論文標題 The cardiac glycoside ouabain activates NLRP3 inflammasomes and promotes cardiac inflammation and dysfunction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0176676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0176676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sadatomo Ai, Inoue Yoshiyuki, Ito Homare, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Mizushima Yoshiko, Nakamura Jun, Kamata Ryo, Kasahara Tadashi, Horie Hisanaga, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 199
2. 論文標題 Interaction of Neutrophils with Macrophages Promotes IL-1 Maturation and Contributes to Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3306 ~ 3315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Akira, Karasawa Tadayoshi, Tago Kenji, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Usui-Kawanishi Fumitake, Watanabe Sachiko, Ohta Satoshi, Funakoshi-Tago Megumi, Yanagisawa Ken, Kasahara Tadashi, Suzuki Koichi, Takahashi Masafumi	4. 巻 199
2. 論文標題 ARH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3614 ~ 3622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Karasawa Tadayoshi, Kawashima Akira, Usui-Kawanishi Fumitake, Watanabe Sachiko, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Shirasuna Koumei, Koyama Yutaro, Sato-Tomita Ayana, Matsuzaka Takashi, Tomoda Hiroshi, Park Sam-Yong, Shibayama Naoya, Shimano Hitoshi, Kasahara Tadashi, Takahashi Masafumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages Highlights	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 744 ~ 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.117.310581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木村博昭	4. 巻 260
2. 論文標題 医学のあゆみ (甲状腺疾患のすべて)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 729 ~ 734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 1) 木村博昭, 安齋文弥, 唐澤直義, 駒田敬則, 鎌田諒, 笠原忠, 三浦典子, 大野尚仁, 高橋将文
2. 発表標題 CAWS誘導川崎病様マウス血管炎におけるインフラマソームの役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 2) 木村博昭, 唐澤直義, 駒田敬則, 鎌田諒, 笠原忠, 高橋将文
2. 発表標題 脂肪細胞分化における免疫プロテアソームの役割
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村博昭、唐澤直義、渡邊幸子、鎌田涼、鈴木幸一、高橋将文
2. 発表標題 脂肪細胞分化における免疫プロテアソームの役割
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村博昭、唐澤直義、渡邊幸子、鎌田涼、駒田敬則、笠原忠、高橋将文
2. 発表標題 脂肪細胞分化におけるLMP7の役割
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村博昭、唐澤直義、岩崎有作、矢田俊彦、高橋将文
2. 発表標題 高脂肪食による肥満性炎症におけるCaspase-1の役割
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroaki Kimura, Tadayoshi Karasawa, Sachiko Watanabe, Koichi Suzuki, Patrizio Caturegli, Masafumi Takahashi
2. 発表標題 Contribution of the immunoproteasome to the inflammatory phenotype observed in obese mice
3. 学会等名 Immunology 2017 (AAI) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村博昭, 唐澤直義, 渡邊幸子, 笠原忠, 高橋将文
2. 発表標題 高脂肪食誘導による肥満性炎症におけるCaspase-1の役割
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村博昭, 中村潤, 渡邊幸子, 唐澤直義, 鎌田涼, 笠原忠, 三浦典子, 大野尚仁, 高橋将文
2. 発表標題 CAWS誘導川崎病様マウス血管炎のIL-10による病態抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 HP http://www.jichi.ac.jp/inflammation/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 将文 (TAKAHASHI MASAFUMI) (40296108)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	渡邊 幸子 (WATANABE SACHIKO) (80770619)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関