

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2020

課題番号：17KT0132

研究課題名(和文)肥満に伴う難治性喘息と好酸球体内動態及びその制御

研究課題名(英文) Obesity-induced activation of cytokine-producing cells and eosinophils in adipose tissues.

研究代表者

高木 智 (Takaki, Satoshi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・免疫制御研究部長

研究者番号：10242116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：不飽和脂肪酸を摂取したマウスでは、飽和脂肪酸摂取群よりも脂肪内のNK細胞群が増加し、IFN γ 産生細胞の割合が増加することを見出した。IFN γ は炎症性細胞群を誘導するとともにIL-5産生低下による好酸球減少に繋がり脂肪炎症が進行する。脂肪におけるIFN γ 産生細胞増加は脂肪肥大が明らかではない早期の脂肪負荷後1週間から生じることがわかった。摂取より数日で不飽和脂肪酸の代謝物が脂肪組織で著しく増加した。内臓脂肪を細片化し組織培養を行い、NK細胞活性化能を比較検討した。不飽和脂肪酸代謝物存在下に培養した脂肪組織の膜分画では、IFN γ 陽性細胞誘導能が増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肥満に伴う脂肪炎症の発生機構、それに引き続く脂肪組織や肺の好酸球動態およびその制御機構を解析した。社会的にも問題となっているアレルギーやメタボリックシンドロームの制御に有用な知見収集を目指した。不飽和脂肪酸摂取により、内臓脂肪内NK細胞群の増加とIFN γ 産生がより活性化することを見出し、脂肪細胞の変化および修飾による脂肪炎症の初動機構理解に役立つものである。

研究成果の概要(英文)： Obesity-induced adipose tissue inflammation is now recognized to have critical roles in the development of metabolic diseases. Recently it has been shown that NK/ILC1s in adipose tissues are activated in early stage of inflammation in response to high fat diet (HFD). Mice fed with HFD mainly composed of unsaturated fatty acids showed significant obesity compared to those fed with HFD mainly composed of saturated fatty acids. We then investigated changes in adipose in early stage of HFD feeding. Mice fed by HFD with unsaturated fatty acids showed increased IFN γ + NK1.1+ cells in adipose tissues by 1 week after HFD start. We found that products of lipid peroxidation derived from unsaturated fatty acids were significantly increased in adipose tissues. We prepared membrane fractions of adipose tissues cultured in the presence of products of lipid peroxidation, and found that the membranes induced more IFN γ + NK1.1+ cells compared to membranes from adipose tissues cultured with medium alone.

研究分野：免疫学 実験病理学

キーワード：脂肪組織 肥満 サイトカイン 好酸球

1. 研究開始当初の背景



アレルギー性気道炎症を病態とする喘息では、2型ヘルパーT(Th2)細胞が産生するIL-5により誘導される好酸球が、組織障害やリモデリングを引き起こす。近年IL-5を大量に産生する2型自然リンパ球(ILC2)が同定され、Th2細胞とともに気道過敏性の獲得に重要な役割を果たすことが分かってきた。一方、肥満によるインスリン抵抗性や耐糖能異常の形成には、NK細胞の活性化から炎症性M1マクロファージの集積による脂肪の慢性炎症が大きく関与する。脂肪組織の好酸球は、抗炎症性M2マクロファージ、白色脂肪細胞のベージュ脂肪細胞化を誘導することにより脂肪炎症及び脂肪蓄積を抑制して耐糖能維持に寄与する。好酸球を軸とした制御機構がアレルギー炎症、脂肪代謝の鍵として注目されるが、好酸球の体内動態に制御されているのか十分明らかではない。難治性喘息で肥満を伴うと肺組織内の好酸球が増加し症状増悪に関与する。この際、喀痰中IL-5濃度や肺実質組織内の好酸球数が肥満度と相関することが報告されている。肥満の脂肪組織においては好酸球が減少するが、脂肪と肺の好酸球動態が相互に関連するのか、また関連する場合の分子機構については全く不明である。IL-5遺伝子座にGFP変異体Venusをノックインしたマウス(IL-5/Venusマウス)を開発し、肺にIL-5産生性ILC2が常在することを報告した。皮下及び内蔵脂肪にIL-5産生性ILC2が常在することを明らかにした。ILC2にはIFN- γ 受容体が発現しており、IFN- γ がILC2活性化を抑制することを報告してきた。

2. 研究の目的

カロリーを過剰摂取した際には、脂肪細胞が肥大しNK細胞を含む1型自然リンパ球(ILC1)が活性化される。これらが産生するIFN- γ は、炎症性M1マクロファージの誘導を増幅し脂肪炎症を起こす。さらに、IFN- γ は2型自然リンパ球(ILC2)を抑制し、IL-5産生低下による好酸球減少及びIL-4供給低下に繋がり脂肪炎症が進行する可能性が考えられる。NK細胞を含むILC1の活性化はNK活性化受容体依存性であると報告されているが、脂肪細胞上に発現するNK活性化受容体リガンドの本態は依然不明である。不飽和脂肪酸を主体とする餌を摂取した場合、脂肪組織内のNK細胞活性化が飽和脂肪酸主体の餌よりも顕著であるという予備知見を利用し、NK1.1+細胞の活性化における初動機構を解析する。NK受容体が脂質を認識する場合も知られており、不飽和脂肪酸代謝物による修飾によって新たにNK細胞活性化リガンドが発現する可能性を検討する。脂肪組織や肺の好酸球動態の理解、好酸球誘導や活性化に重要なIL-5の産生源の解明を進めるとともに肥満時のIL-5産生細胞の動態や活性化機構を解析し、アレルギーやメタボリックシンドロームの制御に有用な新知見を収集する。肥満に伴う脂肪内の好酸球減少機構、食事との関連を解明する。

3. 研究の方法

不飽和脂肪酸であるリノール酸を多く含んだ高脂肪食(HFD-U)と飽和脂肪酸であるステアリン酸を多く含んだ高脂肪食(HFD-S)を給餌したマウスを比較検討した(図1)。リノール酸を多く含んだ高脂肪食を摂食させたところ、通常の餌やステアリン酸を多く含んだ高脂肪食と比較して顕著な体重増加、脂肪組織内のM1マクロファージやCD8+T細胞群の増加を伴う脂肪炎症の著しい増悪が誘導されることがわかった。この過程に関わる細胞間相互作用及び分子機構の解明を推進した。

	Control group	HFD-S group	HFD-U group
Fat (gm%)	4.3	30.8	30.8
18:0 Stearic acid 	0.29	14.6	1.7
18:2 Linoleic acid 	1.73	3.1	12.3

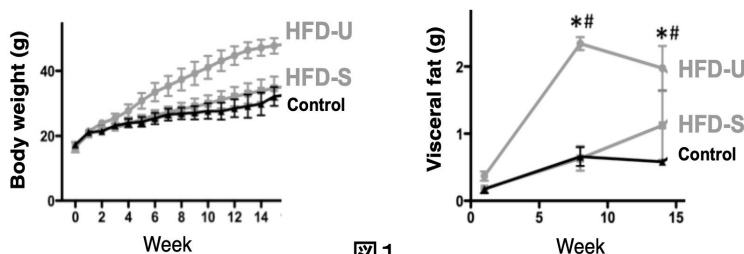
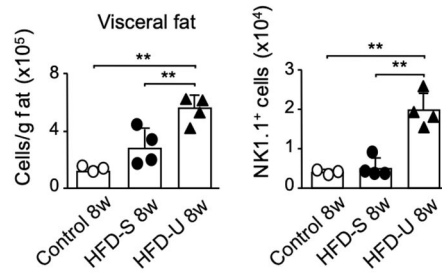


図1

4. 研究成果

不飽和脂肪酸を主体とする高脂肪食(HFD-U)を8週間摂取したマウスでは、飽和脂肪酸高脂肪食(HFD-S)摂取群よりも内蔵脂肪内のNK1.1+細胞群が増加し、CD11b及びKLRG1等の細胞活性化マーカー発現細胞の割合が増加することがわかった(図2)。また、IFN産生細胞の割合が増加することを細胞内染色により見出した。



脂肪炎症の初期変化を検討するべく、高脂肪食の摂食期間1週間の早期の変化について解析を試みた。体重増加にまだ大きな差が出ていないこの早期の段階において、リノール酸を多く含んだHFD-U高脂肪食群では、脂肪組織中のNK1.1+細胞(NK細胞及びILC1細胞)が既に有意に増加していること、NK1.1+細胞分画中で活性化の指標の一つであるCD11b+KLRG1+細胞の割合が増加していることを見出した(図3)。さらに、IFN遺伝子

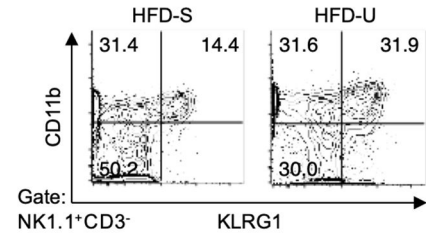


図2

座にGFPを導入したレポーターマウスを用いて検討したところ、脂肪組織内のNK1.1+細胞分画中におけるIFN産生細胞の増加も脂肪肥大が明らかではない早期の脂肪負荷後1週間から生じることがわかった。

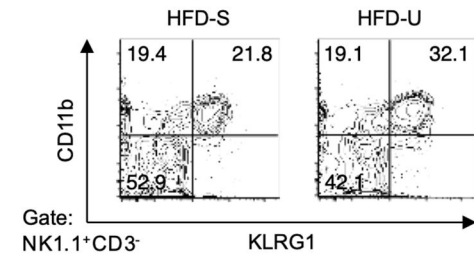
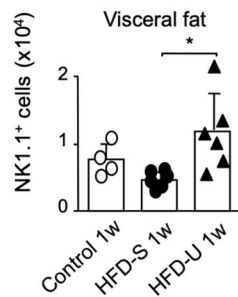


図3

一方、不飽和脂肪酸食を与えたマウスでは、摂取開始より数日から不飽和脂肪酸代謝過程で生成される4-hydroxynonenal(4-HNE)が脂肪組織内で著しく増加することがわかった。4-HNEはアルデヒド基と二重結合とを同一分子内に持ち、シッフ結合及びマイケル付加反応によりタンパク質に結合し修飾あるいは重合を促進する。NK受容体が脂質を認識する場合も知られており、不飽和脂肪酸代謝物による脂肪細胞膜タンパク質の修飾とNK1.1+細胞活性化能の関係について検討を進めた。

野生型マウスより採取した内蔵脂肪組織を数ミリ大にカットし、種々の濃度の4-HNEやヒスチジンを付加してアルデヒド基をブロックしたHNE-Hisを添加し一晩組織培養を行った。また、内蔵脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後、脂肪細胞を除去したstromal vascular fraction(SVF分画)を同時間培養し、NK1.1+細胞に誘導される変化について上述の組織培養と比較した。組織片培養した内蔵脂肪においては、NK1.1+細胞のうちCD11b+CD27-細胞の割合がHNE-His添加により増加した。この画分の増加は、HNE-Hisの濃度依存性であり、SVF分画の培養では全く誘導されなかった(図4)。このこと

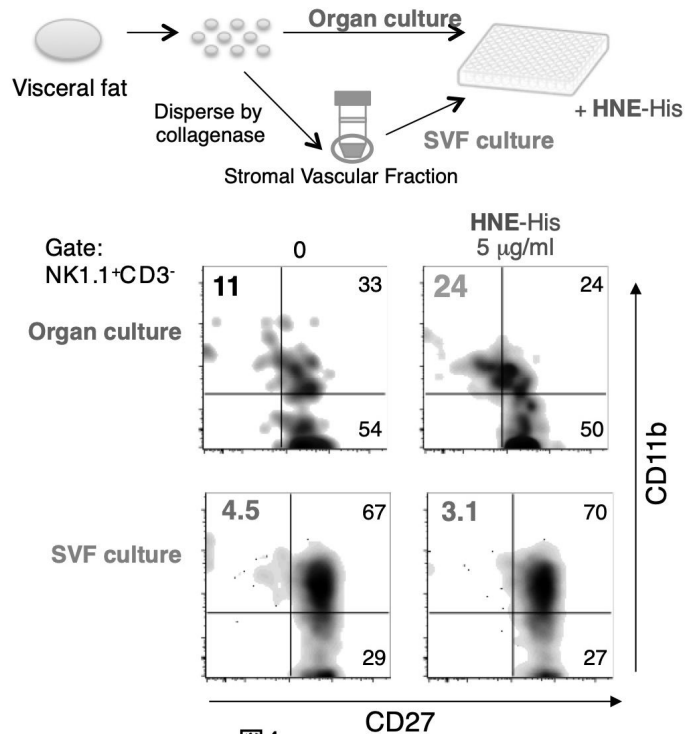


図4

は、NK1.1+細胞の変化誘導に HNE への曝露とともに脂肪細胞との接触ないし細胞間相互作用が必須であることを示す。さらに、組織片にして培養した内臓組織より細胞膜分画を調製し、それらの NK1.1+細胞活性化能を比較検討した。培養組織片から調製した細胞膜分画をプレート上にコーティングし、その上で IFN γ レポーターマウスより調製した脾臓 NK1.1+細胞を播種し、18 時間後の IFN γ 産生をフローサイトメトリーにより検討した。4-HNE 存在下に培養した脂肪組織より調製した膜分画上では、対照となる脂肪組織膜分画上に比し IFN γ 陽性細胞の誘導の増強が観察された。このことから、不飽和脂肪酸代謝物により脂肪組織にて NCR1 リガンドが発現誘導または修飾される可能性が示唆された。

また、肺組織での好酸球制御機構解明の一環として、免疫抑制剤が肺組織内の ILC2 を減少させ、アレルゲン暴露時の活性化及び IL-5 産生を抑制することを明らかにした。カルシニューリン阻害剤であるサイクロスポリンは、移植片拒絶の抑制や重篤な自己免疫疾患の治療に用いられる代表的な免疫抑制剤である。このサイクロスポリンの作用について ILC2 への維持制御に着目し検討した。その結果、サイクロスポリン投与により肺組織内の ILC2 が減少し、アレルゲンとして知られているバブインの経気道的暴露によるアレルギー性気道炎症モデルにおいて、ILC2 活性化及び IL-5 産生を抑制することが明らかとなった。このサイクロスポリン投与で誘導される肺組織における ILC2 の減少は T 細胞や B 細胞を欠く RAG2 欠損では観察されない。また、ILC2 の試験管内培養系において各種サイトカインによる刺激時にサイクロスポリンを添加しても何の効果も観察されないことから、ILC2 への直接的な効果ではなく、T 細胞系を介する間接的な抑制が生じるものと考えられる。免疫抑制剤であるサイクロスポリンが T 細胞活性化を抑制するとともに ILC2 維持及び活性化を抑制し肺組織での炎症を抑える作用を持つことを明らかにした。

一方、接触皮膚炎モデルを用いて、IL-10 を産生する制御性 B 細胞が誘導され炎症応答の抑制に働くこと、マスト細胞が制御性 B 細胞誘導に機能することを明らかにした。この制御性 B 細胞誘導にはマスト細胞由来の IL-5 が必要であり、マスト細胞と B 細胞との共培養における細胞間相互作用により B 細胞に IL-10 産生能が獲得された。IL-10 を産生する制御性 B 細胞の誘導は、さらに ILC2 を抑制し、引き続く IL-13 依存性の皮膚炎症を抑制するというこれまでに知られていなかった IL-5 産生細胞とその細胞間相互作用を介する炎症制御機構を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kim Hyuk Soon, Lee Min Bum, Lee Dajeong, Min Keun Young, Koo Jimo, Kim Hyun Woo, Park Young Hwan, Kim Su Jeong, Ikutani Masashi, Takaki Satoshi, Kim Young Mi, Choi Wahn Soo	4. 巻 5
2. 論文標題 The regulatory B cell-mediated peripheral tolerance maintained by mast cell IL-5 suppresses oxazolone-induced contact hypersensitivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav8152.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aav8152	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 該当する

1. 著者名 Kudo F, Ikutani M, Iseki M, Takaki S.	4. 巻 323
2. 論文標題 Cyclosporin A indirectly attenuates activation of group 2 innate lymphoid cells in papain-induced lung inflammation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Immunology	6. 最初と最後の頁 33-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellimm.2017.10.010.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ikutani M, Tsuneyama K, Nakae S, Takatsu K, Takaki S.
2. 発表標題 Characterization of ILC2 in IL-33-induced chronic inflammation.
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takaki S.
2. 発表標題 IL-5-producing ILC2s and eosinophils in the development of pulmonary arteriopathy.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Cytokines 2017.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ikutani M, Tsuneyama K, Nakae S, Takatsu K, Takaki S.
2. 発表標題 Chronic IL-33-induced inflammation results in pulmonary arterial hypertrophy.
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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		
韓国	Konkuk Univ.		