

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08902

研究課題名(和文) 樹状細胞の過活性化により誘発される耐糖能異常の免疫学的解析

研究課題名(英文) Immunological analysis of glucose intolerance induced by hyperactivated dendritic cells

研究代表者

金子 和光 (KANEKO, YORIAKI)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00334095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病(T2D)の病態形成には免疫異常が強く関与することが知られている。本研究課題においては、樹状細胞(Dendritic Cell:DC)における細胞質型チロシン脱リン酸化酵素Shp-1のT2Dへの関与を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、DC特異的にShp-1を欠損するコンディショナルノックアウトマウス(Shp-1 CKO)は、高脂肪食を負荷しても耐糖能障害の程度が軽く、糖脂質代謝に関するデータ異常も軽度であった。Shp-1 CKOが高脂肪食の負荷に対して抵抗性を示す機序としては、抗炎症性サイトカインであるIL-10の産生亢進や、脾臓での糖の消費が亢進することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD11cを発現するDCやマクロファージにおいてShp-1を欠損させると、高脂肪食を負荷しても耐糖能の悪化が少ないことがコンディショナルノックアウトマウスの解析から明らかになった。今回の解析を通じて、CD11cを発現する細胞のShp-1を標的とした治療法が直ちに開発できる可能性は少ないと思われたが、IL-10をターゲットにする治療法の開発を探索するなど、本研究課題を通じてT2Dの病態解明や治療法の開発における端緒が得られた。

研究成果の概要(英文)：Abnormalities of the immune system are associated with the development of type 2 diabetes (T2D). In this project, we tried to analyze the contribution of a cytoplasmic tyrosine phosphatase Shp-1 expressed on dendritic cells (DC) in the pathogenesis of T2D. Shp-1 CKO the conditional knockout mice, which lack Shp-1 specifically in DC, had a mild degree of glucose intolerance and had mild data abnormalities related to glycolipid metabolism when they were subjected to a high-fat diet (HFD). Increased production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, and increased sugar consumption in the spleen are considered as possible mechanisms for the resistance of Shp-1 CKO to HFD-induced glucose intolerance.

研究分野：免疫学、腎臓病学、リウマチ学

キーワード：樹状細胞 ホスファターゼ Shp-1 2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(Dendritic Cell:DC)はプロフェッショナルな抗原提示細胞であり、T細胞の活性化を通じて獲得免疫に多大な貢献をする。さらに、自然免疫応答においても重要な細胞である。DCの機能障害は自己免疫疾患の発症に深く関わっており、なかでも全身性エリテマトーデス(SLE)においては、DCから産生されるIFN γ の過剰産生がSLEの発症要因の1つとされている。

また、血球系に広く発現が見られる細胞質型チロシン脱リン酸化酵素 Shp-1 を遺伝的に欠損する motheaten マウスでは、抑制性のシグナル伝達機構の障害から、全身性に激しい自己免疫疾患を生じることが明らかになっている。しかし、DCにおける Shp-1 の機能に関しては不明な点が多かった。そこで、申請者らは DC において特異的に Shp-1 を欠損するコンディショナルノックアウトマウス(Shp-1 CKO)を作製して解析を行った。その結果、Shp-1 CKO では DC からの炎症性サイトカインの産生や、T細胞からの IFN γ の産生亢進が見られ、40 週齢を超える Shp-1 CKO において、抗 DNA 抗体の産生と腎炎が発症することを見出している (Kaneko T 他, J Immunol. 2012)。そしてこれらの事実から、DC に発現する Shp-1 は DC の過活性を抑制し、自己免疫の発症に関して防御的な機能を発揮していることが証明できた。

ところで近年になり、腎臓や脂肪組織などに常在するマクロファージが臓器の炎症を助長することが明らかになっている。特に、肥満がもとで耐糖能障害をきたす 2 型糖尿病(T2D)では、脂肪組織の内部に常在するマクロファージを除去することが糖尿病の改善に寄与することがマウスの実験で証明されている。そして、このように炎症を助長する組織常在性マクロファージは DC に特徴的な表面抗原である CD11c を発現していることも明らかになっているので、組織常在性マクロファージはマクロファージと DC の形質をとともに有するハイブリッド型の細胞であると考えられている。本研究課題においては、Shp-1 CKO に見られる DC が過活性になる事実に着目し、Shp-1 CKO を用いて T2D のモデルを作成すると、DC や組織常在性マクロファージが炎症を助長して耐糖能が悪化するという仮説をたて、Shp-1 CKO の糖代謝異常における DC や組織常在性マクロファージの意義を解析した。また、腎臓に常在するマクロファージの解析も合わせて行った。

2. 研究の目的

DC は T 細胞や B 細胞などの様々な免疫細胞の機能を調整する細胞であり、獲得および自然免疫応答に重要な細胞である。T2D においては T 細胞や B 細胞に機能が失調することはこれまでに報告されているので、Shp-1 CKO における耐糖能異常における T 細胞や B 細胞の関与が証明されれば T2D における免疫応答の異常がより一層明らかにできる。このように、本研究課題は T2D の病態解明を進めることと、新規治療法の端緒を得ることを目的として行われた。

3. 研究の方法

DC における Shp-1 の機能解析を目標にコンディショナルノックアウトマウスである Shp-1 CKO を作製して研究に用いた。Shp-1 CKO は Cre-loxP システムを用いて DC のマーカーである CD11c を発現する細胞に特異的に Shp-1 を欠損する特徴を有しており、遺伝的背景は C57/BL6 である。腎常在性マクロファージの解析には 8 週齢の C57/BL6 を用いた。また、Shp-1 CKO を用いて高脂肪食(High Fat Diet: HFD)を負荷して耐糖能異常をきたす T2D のモデル(HFD モデル)を作成したが、このモデルには 8 週齢の Shp-1 CKO を用いて行った。体重の変化は毎週確認し、HFD 開始後 12 週経た時点で空腹時血糖を測定し、グルコースの負荷試験とインスリン負荷試験を行った。さらに糖脂質代謝に関する検討を行い、アディポカインとサイトカインを ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

4-1. 腎常在性マクロファージの機能解析

フローサイトメーター(FCM)でマクロファージを同定する際には CD11b や F4/80 を用いることが多いが、腎臓に常在するマクロファージを FCM で解析したところ、腎常在性マクロファージは CD11b や F4/80 に加えて DC のマーカーと考えられる CD11c を共に発現することが確認された。さらに腎常在性マクロファージを単離する際には DC の分離に準じた酵素処理を行うことが重要なことが判明した。また、Shp-1 CKO にウシのアルブミンを免疫することによって誘導する実験腎炎のモデルを Shp-1 CKO に施行したところ、Shp-1 CKO ではクレアチニンの上昇や尿タンパクの顕在化などの腎機能の悪化がみられた。そして、腎炎を発症した Shp-1 CKO の腎臓内には腎常在性マクロファージが増加しており、なかでも F4/80 を強く発現するマクロファージの

増分が大きかった。この事実は、腎炎の形成過程において組織常在性マクロファージの活性化が病態形成に大きく寄与することを示唆することとなった。

4-2. Shp-1 CKO における糖脂質代謝の変化

Shp-1 CKO に対して T2D のモデルを行ったところ、Shp-1 CKO は高脂肪食を負荷した場合の体重の増加率はコントロールと同様であった。しかし、グルコース負荷試験とインスリン負荷試験において耐糖能の改善が得られ、空腹時の血中インスリンとグルコース値から計算されるインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR も Shp-1 CKO において改善することが判った。さらに、血中の糖脂質代謝に関するマーカーを検討したところ、コレステロールや中性脂肪、さらに遊離脂肪酸などが Shp-1 CKO において改善している事実が得られた。また、Shp-1 CKO においてはアディポネクチンの産生量がコントロールと同等であったが、Shp-1 CKO においてレプチンが有意に低下していた。通常、HFD モデルをマウスに施行した場合に、体重増加と耐糖能の悪化が並行してみられることが多く、内蔵脂肪の増加が糖代謝を悪化させる方向に寄与するといった報告が多い。しかし、Shp-1 CKO においては体重の増分がコントロールと同様の傾向を示した割に糖代謝の改善が得られた。この事実は肥満になった Shp-1 CKO の体内において、糖の消費に関与する筋肉などと、糖代謝に悪影響を及ぼす内蔵脂肪の構成に変化が起きたことを示唆する結果となった。

4-3. Shp-1 CKO における体組成の変化

高脂肪食負荷を行った Shp-1 CKO において、体重の変化と耐糖能の改善が乖離した事実に着目して、Shp-1 CKO の内蔵脂肪の分布と筋肉量の変化をマウス用の X 線 CT である Iatheta LCT-200 を用いて測定した。その結果、高脂肪食負荷後の Shp-1 CKO では筋肉を含めた内蔵脂肪以外の腹腔内の構成要素が増加する事実を得た。中でも顕著な脾腫が見られることが判明した。そして、グルコースのアナログである 2-NBDG を用いて脾臓細胞による糖の取り込みを確認したところ、高脂肪食負荷を行った Shp-1 CKO において、脾臓による糖の消費が亢進することを示唆する結果が得られた。つまり Shp-1 CKO が高脂肪食負荷に抵抗を示す機序として、増大した脾臓による糖の消費の亢進が重要なことが判明した。

4-4. Shp-1 CKO における免疫学的異常の解析

高脂肪食の負荷により肥満となった Shp-1 CKO の血中におけるサイトカインを測定したところ、Shp-1 CKO では炎症性サイトカインである IL-6 と TNF の産生量に変化はなかったが、抗炎症性のサイトカインである IL-10 の産生が有意に亢進していた。また、腹腔内に B 細胞の亜群である B1 細胞の増生がみられた。

結論

CD11c 陽性細胞特異的に Shp-1 を欠損する Shp-1 CKO では、DC が過活性となることから自己免疫疾患を発症する。しかし Shp-1 CKO を用いて T2D のモデルで行っても、Shp-1 CKO は耐糖能異常の程度が軽度であった。この事実は、DC などの CD11c 陽性細胞に発現する Shp-1 は T2D 発症に対して抑制性に寄与することを意味し、T2D の新規治療法の標的となりうる可能性を示唆するものであった。今後は、高脂肪食負荷によって肥満となった Shp-1 CKO の免疫異常に関して、Th 細胞や制御性 T 細胞などに関して機能解析をさらに進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mitsuharu Watanabe, Yoriaki Kaneko, Yuko Ohishi, Masato Kinoshita, Toru Sakairi, Hidekazu Ikeuchi, Akito Maeshima, Yasuyuki Saito, Hiroshi Ohnishi, Yoshihisa Nojima, Takashi Matozaki, Keiju Hiromura	4. 巻 22 (100741)
2. 論文標題 Importance of methodology in the evaluation of renal mononuclear phagocytes and analysis of a model of experimental nephritis with Shp1 conditional knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100741	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shreya Shrestha, Yoriaki Kaneko, Masato Kinoshita, Yoichi Imai, Junya Suwa, Mitsuharu Watanabe, Yuko Ohishi, Yasuyuki Saito, Hiroshi Ohnishi, Takashi Matozaki, Keiju Hiromura
2. 発表標題 CD11c-dependent ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 improves insulin resistance
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Kinoshita, Y. Kaneko, M. Watanabe, Y. Imai, S. Shrestha, J. Suwa, Y. Ohishi, H. Hamatani, M. Nakasatomi, T. Sakairi, H. Ikeuchi, Y. Nojima, K. Hiromura.
2. 発表標題 CD11C-SPECIFIC ABLATION OF SHP1 INDUCES AUTOIMMUNE SIALADENITIS SIMILAR TO SJOGREN'S SYNDROME
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 諏訪絢也, 金子和光, 渡辺光治, 今井陽一, Shrestha Shreya, 木下雅人, 大石裕子, 中里見征央, 浜谷博子, 坂入徹, 池内秀和, 廣村桂樹
2. 発表標題 腎虚血再灌流によりMSR1を高発現したマクロファージが増加する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shreya Shrestha, Yoriaki Kaneko, Mitsuharu Watanabe, Masato Kinoshita, Yoichi Imai, Junya Suwa, Yuko Ohishi, Yasuyuki Saito, Hiroshi Ohnishi, Takashi Matozaki, Keiju Hiromura
2. 発表標題 Specific depletion of Shp1 in CD11c+ cells improves glucose intolerance in high fat diet-induced obesity
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe Mitsuharu, Kaneko Yoriaki, Kinoshita Masato, Shrestha Shreya, Ohishi Yuko, Sakairi Toru, Ikeuchi Hidekazu, Nojima Yoshihisa, Hiromura Keiju
2. 発表標題 Establishment of a Preparative Method and Gating Strategy for Renal Mononuclear Phagocytes (rMophs) and Analysis of rMophs in CD11c-Specific Shp-1 Knockout Mice
3. 学会等名 Kidney Week, American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------