

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23650230

研究課題名（和文）肥満モデルマウス脂肪組織の慢性炎症に対する DPP-4 阻害薬の病態改善効果

研究課題名（英文）Effect of DPP-4 inhibitor on chronic adipose tissue inflammation in obesity mouse model

研究代表者

久和 茂 (KYUWA SHIGERU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30177943

研究成果の概要(和文)：ナチュラルキラーT (NKT) 細胞の脂肪組織炎症への影響を調べるために、肥満およびやせ(対照群)の C57BL/6J マウスの内臓脂肪組織の NKT 細胞のサブセットについて解析した。やせマウスの脂肪組織の NKT 細胞のリンパ球全体に対する割合は脾臓や末梢血よりも大きく、脂肪組織の一部の NKT 細胞は CD69 を高発現し、細胞内 IFN- $\gamma$  の発現も高く、脂肪組織の NKT 細胞は何らかのメカニズムにより活性化されていることが示唆された。3T3-L1 細胞の *in vitro* での脂肪細胞への分化系を用いて解析したところ、3T3-L1 細胞の IFN- $\gamma$  受容体は分化前と脂肪細胞成熟後に発現していた。IFN- $\gamma$  刺激による 3T3-L1 細胞の PPAR $\gamma$  の発現量は分化初期では有意に低下したが、脂肪細胞成熟後では上昇した。一方、3T3-L1 細胞の CD1d1 の発現は脂肪細胞の分化に伴って顕著に増加し、さらに IFN- $\gamma$  の刺激によってさらに増加した。NKT 細胞と 3T3-L1 細胞の共培養を行ったところ、NKT 細胞の IFN- $\gamma$  産生の増加と 3T3-L1 細胞の CD1d1 発現の上昇がみられ、NKT 細胞と脂肪細胞は相互作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand a physiological and pathological role of natural killer T (NKT) cells on inflammation in adipose tissue, we characterized a subset of NKT cells in abdominal and subcutaneous adipose tissues in C57BL/6J mice fed on normal or high-fat diets. NKT cells comprised a larger portion of lymphocytes in adipose tissues compared to the spleen and peripheral blood. Furthermore, some NKT cells in adipose tissues expressed higher levels of CD69 and intracellular interferon- $\gamma$ . We speculate that the NKT cells in adipose tissues may form an equivalent subset in other tissues and that these subsets are likely to participate in adipose tissue inflammation. Additionally, the high expression level of CD69 and intracellular IFN- $\gamma$  raises the possibility that some NKT cells in adipose tissue may be stimulated by some physiological mechanism. IFN- $\gamma$  suppressed adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. CD1d1 was expressed in 3T3-L1 mature adipocytes and was enhanced by IFN- $\gamma$  stimulation. Cocultures of NKT cells and 3T3-L1 adipocytes resulted in increased IFN- $\gamma$  secretion from NKT cells and increased CD1d1 expression in adipocytes in an IFN- $\gamma$ -dependent manner. Our findings strongly suggest that iNKT cells communicate with adipocytes via CD1d1 and IFN- $\gamma$ .

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：疾患モデル、糖尿病、慢性炎症、脂肪組織、免疫、NKT 細胞、インターフェロン- $\gamma$ 、相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満は、医学的には脂肪が一定以上に多くなった状態をいう。肥満の判定は通常、肥満指数(BMI)で行われ、以下の式で計算される。

$$\text{BMI} = \text{体重 (kg)} / \text{身長 (m)}^2$$

日本肥満学会ではBMIが25以上を肥満としている。国の調査では成人日本人男性の肥満の割合は年々増加し、現在は約30%であると言われている。肥満は遺伝要因よりも環境要因に強く作用されるといわれ、肥満の原因は食事によるカロリー過剰摂取や運動不足などの生活習慣だというのが通説である。

(2) 従来、疫学的研究から肥満は高血圧、脂質異常症、糖尿病などの疾患と関連があり、それら生活習慣病の起因であると理解されてきた。しかし、近年肥満そのものが1つの病気であることが示された。つまり、マウスに高脂肪食を与えると内臓脂肪が蓄積し、それらの部位でリンパ球やマクロファージ等の浸潤を伴った慢性炎症が起こり、その結果脂肪組織はリモデリングし、またインスリン抵抗性になることが明らかとなった。このように肥満による2型糖尿病は免疫介在性の炎症疾患であり、一種の自己免疫病である可能性が示唆されている。

(3) 2型糖尿病の新たな治療薬としてシタグリプチン(sitagliptin)などのdipeptidyl peptidase IV (DPP-4)阻害薬が注目されている。食事を取ると、通常小腸からグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)などのインクレチンが分泌され、それが膵β細胞に作用し、インスリンの分泌を促す。インクレチンは主にDPP-4によって分解されるので、DPP-4を介するインクレチンの分解抑制を目的としてDPP-4阻害薬が開発された。実際、DPP-4欠損マウスは肥満やインスリン抵抗性に対して抵抗性である。さらに、DPP-4阻害薬はインクレチンを介さないTリンパ球遊走阻害効果があることも示され、このためにDPP-4阻害薬は1型糖尿病の自己免疫性膵島病変を改善するのではないかと推測されている。

## 2. 研究の目的

(1) C57BL/6Jマウスに高脂肪食を長期間与えた肥満モデル(DIO)マウスの内臓脂肪組織慢性炎症に対して、DPP-4阻害薬がTリンパ球遊走阻害効果等によりDIOマウス脂肪組織慢性炎症の改善に効果があるかどうか検討することを当初目的としていた。

(2) しかし、Kimら(Life Sci 90:21-29, 2012)、Liuら(Acta Pharmacol Sin 33:1013-22, 2012)などにより、DPP-4阻害薬のDIOマウスの症状改善効果が相次いで報告されたため、当初の研究計画を変更せざるえなかった。

(3) それで、本研究ではDIOマウスを用いて、NKT細胞の脂肪組織炎症における役割について詳しく検討することにした。また正常マウスの脂肪組織におけるNKT細胞の機能と役割についても検討した。

(4) さらに、NKT細胞と脂肪細胞の相互作用に着目し、脂肪細胞の分化成熟におけるNKT細胞の機能と役割について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 高脂肪食給餌肥満(DIO)マウスの作製：雄の8週齢C57BL/6JマウスをSPF環境で維持し、高脂肪食としてResearch Diets社D12492を給餌し、普通食の対照群にはオリエンタル酵母CRF-1を与えた。Nishimuraら(Nat Med, 15: 914-921, 2009)は4週齢から高脂肪食を与えているが、この方法ではマウス個体間の体重のばらつきが大きく、以後の解析に悪影響がでると判断した。そのため、免疫系機能が成熟し、腸内フローラが安定する8週齢から同飼料を給餌することにした。その結果、マウス個体間の体重のばらつきが少ないDIOマウスを準備することが可能となった。

(2) 実験デザイン：上述のようにDIOは8週齢、雄のC57BL/6Jマウスに高脂肪食(リサーチダイエツ社、D12492)を給餌して作製し、一部実験ではIFN-γ欠損マウスおよびインバリアントNKT(iNKT)細胞を欠損するJα18欠損マウスを用いた。精巣上体脂肪組織を摘出し、脂肪組織の組織標本作製して病態を評価した。NKT細胞を特定するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いた脂肪組織イメージングを行った。さらにフローサイトメトリーによる免疫細胞集団の特定および産生サイトカインの解析、定量的PCR法によるサイトカイン遺伝子発現量解析を行い、脂肪組織炎症を評価した。また、2型糖尿病の評価にはグルコース耐性試験を用いた。

(3) マウス中胚葉由来線維芽細胞株である3T3-L1細胞をデキサメタゾン、IBMX、インシュリンで4日間刺激し、脂肪細胞へ分化させて実験に用い、分化後8日以降を成熟脂肪細胞とした。マウスは8週齢C57BL/6Jを用い、一部実験ではJα18欠損マウスを用いた。ウエスタンブロットリング法により、IFN-γ受容体およびCD1d1の発現を定量した。また、フローサイトメトリーを用いて、NKT細胞およびT細胞の細胞内サイトカイン産生を定量した。その他のサイトカインおよび転写因子の遺伝子発現の定量は定量的PCR法を用いて解析した。一部実験ではiNKT細胞の活性化物質であるα-Galactosylceramide (α-Gal1Cer) (フナコシ、KRN7000)を用いた。また、NKT細胞と脂肪細胞との相互作用を解析するために、NKT細胞と

3T3-L1細胞の共培養を行った。autoMACSおよびセルソーターを用いて、NKT細胞を調製した。

#### 4. 研究成果

(1) 脂肪組織炎症の進行に伴いマクロファージおよびヘルパーT(Th)細胞は増加したが、一方でNKT細胞は変化しなかった。DIOでは脂肪組織炎症に特徴的なcrown-like structure (CLS)が認められ、またCLSにNKT細胞の浸潤が観察された。細胞内サイトカイン染色により、DIOの脂肪組織T細胞は主にIFN- $\gamma$ を産生するが、NKT細胞の一部はIL-4を産生していることが示された。

(2) IFN- $\gamma$ と脂肪組織炎症の関係を調べるためにIFN- $\gamma$ 欠損マウスを用いて実験を行った。IFN- $\gamma$ 欠損マウスは肥満を呈するものの、T細胞はIL-4を産生し、耐糖能の低下が野生型DIOマウスに比べて軽度であった。さらにiNKT細胞がIL-4を産生して脂肪組織炎症を抑制すると仮説を立て、J $\alpha$ 18欠損マウスを用いて実験を行った。仮説に反してJ $\alpha$ 18欠損マウスでは野生型マウスに比べて炎症性サイトカインの発現量が低下し、脂肪組織炎症が軽度であった。さらにJ $\alpha$ 18欠損マウスではT細胞のIFN- $\gamma$ 産生が低下し、細胞障害性T細胞やナチュラルキラー(NK)細胞のIFN- $\gamma$ 産生も低下していた。

(3) これらの結果は、IFN- $\gamma$ が脂肪組織炎症の増悪因子であり、Th1型炎症が糖尿病を悪化させる要因の一つであることを示唆している。一方で、iNKT細胞とは異なるNKT細胞がIL-4を産生することで脂肪組織炎症を抑制している可能性が示唆された。さらにiNKT細胞はIFN- $\gamma$ 産生をすることでTh1細胞と同様にヘルパー機能を有し、細胞障害性T細胞、NK細胞のIFN- $\gamma$ 産生を促進させることで、脂肪組織炎症を間接的に悪化させていることが示唆された。

(4) 正常8週齢マウス脂肪組織において、iNKT細胞はIFN- $\gamma$ およびIL-4を産生していた。またJ $\alpha$ 18欠損マウスでは体重および脂肪組織重量に有意な差はないものの、T細胞のIFN- $\gamma$ 産生が低下していた。3T3-L1細胞のIFN- $\gamma$ 受容体は分化前と脂肪細胞成熟後に発現していた。IFN- $\gamma$  (50ng/ml)刺激による3T3-L1細胞のPPAR $\gamma$ の発現量は分化初期では有意に低下したが、脂肪細胞成熟後では上昇した。またiNKT細胞を強力に活性化する $\alpha$ -GalCer (4 $\mu$ g/mouse)を投与したマウスの脂肪組織では、IFN- $\gamma$ の発現量が極めて高くなり、PPAR $\gamma$ の発現が有意に低下した。

(5) 3T3-L1細胞の分化成熟とiNKT細胞に対する抗原提示分子であるCD1d1の発現量の関

係を調べた。CD1d1の発現は脂肪細胞の分化に伴って顕著に増加し、さらにIFN- $\gamma$ の刺激によってさらに増加した。NKT細胞と脂肪細胞の相互作用を解明するために、脾臓より分離したNKT細胞と3T3-L1細胞の共培養を行った。NKT細胞のIFN- $\gamma$ 産生の増加と3T3-L1細胞のCD1d1発現の上昇がみられた。J $\alpha$ 18欠損マウスではCD1d1の発現量が低下していた。

(6) これらの結果は、正常マウスの脂肪組織において、NKT細胞はIFN- $\gamma$ を介して脂肪細胞の分化を制御しており、IFN- $\gamma$ の刺激を受けた成熟脂肪細胞はCD1d1を介してiNKT細胞を活性化していることが示唆し、iNKT細胞と脂肪細胞が生理的に相互作用を行っていることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

(1) 近藤泰介、久和茂、脂肪組織とNKT細胞—NKT細胞は糖尿病をコントロールできるか?—、医学のあゆみ、2013、印刷中 doi:なし

(2) Taisuke KONDO, Yujiro TOYOSHIMA, Yoshiyuki ISHII, Shigeru KYUWA, Natural Killer T Cells in Adipose Tissue Are Activated in Lean Mice, Exp Anim. 2013. in press, doi:なし

[学会発表](計4件)

(1) KONDO Taisuke, SEKIYA Takashi, YOSHIMURA Akihiko, KYUWA Shigeru, Evidence that NKT cells regulate adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 5, 2012. Kobe International Convention Center, Kobe, Hyogo Prefecture.

(2) 近藤泰介、石井寿幸、久和茂、高脂肪食誘導肥満モデルマウスの脂肪組織炎症におけるNKT細胞の機能解析、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14日、岩手大学、岩手県

(3) 近藤泰介、豊島祐次郎、石井寿幸、久和茂、高脂肪食誘導肥満モデルマウスの脂肪組織におけるNKT細胞の動態、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月19日、大阪府立大学、大阪府

(4) 近藤泰介、久和茂、マウスの脂肪組織におけるNKT細胞の分布と性質、T細胞レセプターV $\beta$ レパトワの解析、第58回日本実験動物学会

総会、2011年5月27日、タワーホール船堀、  
東京都

[図書](計1件)

(1) 久和茂(編著、共著)、朝倉書店、実験動物  
学、2013年、191頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/jitsudo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久和 茂(KYUWA SHIGERU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教  
授

研究者番号:30177943