

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590577

研究課題名(和文) 脂肪組織炎症を制御する自然免疫分子と薬物の探索

研究課題名(英文) Search for innate immune molecules and compounds that regulate adipose tissue inflammation

研究代表者

長井 良憲 (NAGAI, Yoshinori)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・客員准教授

研究者番号：30431761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食摂餌により、内臓脂肪組織において可溶性MD-1が産生されることを見出した。MD-1トランスジェニックマウスは、野生型マウスと比べて血清可溶性MD-1の過剰産生を認めたが、内臓脂肪組織炎症、肥満、インスリン抵抗性に変化を認めなかった。

また、RP105/MD-1及び炎症マーカーの発現を低下させる天然薬物としてisoliquiritigeninを見出した。高脂肪食マウスへのisoliquiritigeninの投与により、内臓脂肪組織の炎症反応及びIL-1産生が抑制され、肥満、インスリン抵抗性に顕著な改善効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We found that soluble MD-1 was produced in white adipose tissue (WAT) from high-fat diet (HFD)-fed mice. To investigate roles of soluble MD-1, we generated MD-1 transgenic (Tg) mice that produced large amount of soluble MD-1 in sera. However, no significant differences between wild-type and MD-1 Tg mice were found in body weights, adipose tissue inflammation, and insulin resistance on a HFD.

We also demonstrated that isoliquiritigenin, a component of Glycyrrhiza uralensis, suppressed the expression of RP105/MD-1 and inflammatory cytokines. In vivo analyses revealed that supplementation of isoliquiritigenin inhibited HFD-induced inflammatory responses and IL-1 production in WAT, obesity, and insulin resistance.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 自然免疫 肥満

### 1. 研究開始当初の背景

近年、自然免疫系の病原体センサーである Toll 様受容体 (TLR) は、病原体由来の抗原だけでなく、自己由来の内因性抗原に対しても応答し、DNA や脂質などの自己抗原に対して生体が過剰に反応しないように防御していることが明らかになりつつある。さらにその破綻が慢性炎症性疾患の発症や進展に繋がることが動物モデルを用いて明らかになりつつある。

研究代表者は、TLR 類似分子 RP105 が高脂肪食摂餌による内臓脂肪組織炎症の発症・進展に大きな役割を果たすことを見出した。また、RP105 会合分子 MD-1 の可溶型が高脂肪食摂餌マウスの血清で増加することを見出した。MD-1 は脂質が結合し得る構造を持つことから、内因性の脂質が結合し、内臓脂肪組織炎症の病態に関与する可能性が示唆された。さらに *in vitro* の内臓脂肪組織炎症モデルにおいて、炎症の程度と RP105/MD-1 の発現レベルとが正に相関することを見出した。

以上から、内臓脂肪組織炎症における RP105/MD-1 の機能を明らかにし、それを制御し得る薬剤を探索することは、新たな制御法開発に繋がることが期待された。

### 2. 研究の目的

本研究では、1) 脂肪組織の恒常性維持における自然免疫シグナルの機能を解析し、その破綻としての肥満や 2 型糖尿病など慢性炎症の発症機構を解明する、2) 次世代の医薬品シーズ開発を目指し、脂肪組織炎症を抑制する薬剤を探索する、3) 研究代表者が見出した可溶型 MD-1 の脂肪組織炎症における機能を解析し、RP105/MD-1 シグナルを抑制する薬剤や制御系を探索する、ことを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 脂肪組織炎症における可溶型 MD-1 の発現と機能の解析：(a) 高脂肪食を摂餌した野生型マウスより内臓脂肪を採取し、可溶型 MD-1 を産生する細胞の同定を試みた。以下のように細胞を分画・単離した。脂肪細胞と SVF (stromal vascular fraction: 脂肪細胞以外の細胞分画) SVF 中の CD45 陽性細胞と CD45 陰性細胞、CD45 陽性細胞中の F4/80 陽性マクロファージと F4/80 陰性非マクロファージ、F4/80 陽性マクロファージ中の M1 (炎症性) マクロファージと M2 (抑制性) マクロファージ、単離した細胞を *in vitro* で培養し、培養上清中の MD-1 を ELISA 法で検出した。さらに分画した細胞の全 RNA を抽出し、リアルタイム PCR (RT-PCR) で MD-1 mRNA 発現を検討した。(b) 脂肪細胞とマクロファージとの共培養による脂肪組織炎症モデルにおいて、可溶型 MD-1 が産生されるかどうか、ELISA 法で解析した。(c) 脂肪細胞とマクロファージの共培養系にリコンビナント MD-1 を添加し、炎症が増強されるかどうか、TNF- $\alpha$  や MCP-1 を指標に RT-PCR 法で解析した。

(d) MD-1 トランスジェニック (Tg) マウスに高脂肪食を摂餌させ、脂肪組織において可溶型 MD-1 量が増加するかどうか ELISA 法やウエスタンブロット法を用い、検討した。(e) 高脂肪食を摂餌した MD-1 Tg マウスにおいて、脂肪組織炎症や肥満、糖尿病が増悪するかどうか以下の点について解析した。体重、脂肪組織炎症の程度、内臓脂肪に浸潤したマクロファージなどの炎症細胞の数、空腹時血糖値や血清コレステロール値、インスリン負荷試験、グルコース負荷試験。

(2) RP105/MD-1 の発現を抑制する薬剤の探索：(a) 脂肪細胞とマクロファージとの共培養系に薬剤を添加し、炎症を抑制する薬剤をスクリーニングした。RP105/MD-1 の発現を低下させ、炎症を抑制する候補薬剤を探索した。(b) RP105/MD-1 の発現を低下させることを見出している天然薬剤 isoliquiritigenin が PPAR 活性化能を有するかどうか検討した。(c) isoliquiritigenin が脂肪細胞とマクロファージのどちらに作用し、炎症抑制作用を示すのか解析した。(d) isoliquiritigenin の個体レベルでの効果を解析した。高脂肪食に isoliquiritigenin を混餌し、肥満・2 型糖尿病に対して治療効果を認めるかどうか解析した。

### 4. 研究成果

(1) 脂肪組織炎症における可溶型 MD-1 の発現と機能の解析：(a) 高脂肪食を摂餌した野生型マウスより内臓脂肪を採取し、脂肪細胞と SVF (stromal vascular fraction: 脂肪細胞以外の細胞分画) とに分画し、可溶型 MD-1 の産生を解析した。内臓脂肪組織において、高脂肪食によって誘導される可溶型 MD-1 は、主に SVF から産生されることを見出した。(b) 脂肪細胞株とマクロファージ細胞株との共培養後の培養上清中における可溶型 MD-1 量を ELISA 法で解析したが、検出されなかった。(c) MD-1 Tg マウス及び野生型マウスに高脂肪食を摂餌させ、脂肪組織炎症や肥満、糖尿病状態を比較解析した。MD-1 Tg マウスは野生型マウスと同等の脂肪組織炎症、肥満、糖尿病状態を示すことが分かった。(d) 脂肪組織において可溶型 MD-1 を産生する細胞の同定を進める予定であったが、可溶型 MD-1 の過剰産生が脂肪組織炎症の増悪に関与しないことが示唆されたため、その同定は見送ることとした。(2) RP105/MD-1 の発現を抑制する薬剤の探索：(a) 脂肪細胞株とマクロファージ細胞株との共培養系において、RP105/MD-1 の発現や炎症マーカーの発現を低下させる天然薬剤 isoliquiritigenin と類似の骨格を持つ天然薬剤の効果と比較解析した。共培養系において、6 つの類似天然薬剤は isoliquiritigenin のような抗炎症効果を示さなかった。(b) isoliquiritigenin が脂肪組織炎症を抑制する機序が PPAR アゴニスト作用によるものかどうか解析した。PPAR に結合するかどうかを解析したところ、陽性コントロールである

ピオグリタゾンに濃度依存的な結合能を示したが、isoliquiritigeninは弱い結合能しか示さなかった。従って、isoliquiritigeninの脂肪組織炎症抑制効果は、PPAR アゴニスト作用によるものではないことが分かった。

(c)isoliquiritigeninを脂肪細胞株またはマクロファージ細胞株に前処理し、炎症抑制効果を解析した。その結果、前処理したそれぞれの細胞で、弱い炎症抑制効果を認めた。以上から、isoliquiritigeninはどちらの細胞にも作用し、炎症抑制効果を示すことが示唆された。(d)高脂肪食にisoliquiritigeninを混餌し、野生型マウスに摂餌させ、肥満・2型糖尿病に対する効果を検討した。

isoliquiritigeninの混餌により、高脂肪食による肥満・2型糖尿病が見地に改善した。また、内臓脂肪組織の炎症反応及びIL-1 の産生が顕著に抑制された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Yamamoto S, Nagai Y. (17 人中 10 番目) Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Sci. Rep.*, 査読有, 5, Article number:8505, 2015. doi: 10.1038/srep08505.

Tamura K, Nagai Y. (11 人中 7 番目) Increased production of intestinal immunoglobulins in Syntenin-1-deficient mice. *Immunobiology*, 査読有, Vol.220(5);597-604, 2015. doi:10.1016/j.imbio.2014.12.003.

Yanagibashi T, Nagai Y. (6 人中 2 番目) Differential Requirements of MyD88 And TRIF Pathways in TLR4-mediated Immune Responses in Murine B Cells. *Immunol.Letters.*, 査読有,163;22-31, 2015.doi: 10.1016/j.imlet.2014.11.012.

Honda H, Nagai Y. (12 人中 2 番目) Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 査読有, 96 (6):1087-1100, 2014. doi: 10.1189/jlb.3A0114-005RR.

Hikosaka K, Nagai Y. (11 人中 6 番目) Deficiency of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 3 (Nmnat3) Causes Hemolytic Anemia by Altering the Glycolytic Flow in Mature Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 査読有, 289:14796-14811, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.554378.

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志.: 自然免疫系受容体 RP105/MD-1 によるメタボリック症候群の制御. *内分泌・糖尿病・代謝内科*. 査読無,37(6):61-616, 2013.

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients*. 査読有, 5(9): 3757-3778, 2013. doi:10.3390/nu5093757.

Nagai Y, Watanabe Y, Takatsu K. The TLR family protein RP105/MD-1 complex: a new player in obesity and adipose tissue inflammation. *Adipocyte*. 査読有, 2 :61-66, 2013. DOI:10.4161/adip.22929.

Fujisaka S, Nagai Y. (11 人中 9 番目) Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 -dependent and HIF-1 -independent manner in obese mice. *Diabetologia*. 査読有, 56(6):1403-1412, 2013. doi: 10.1007/s00125-013-2885-1.

Rachmawati N.M, Nagai Y.(10 人中 7 番目) Inhibition of antibody production *in vivo* by pre-stimulation of Toll-like receptor 4 before antigen priming is caused by defective B cell priming and not impairment in antigen presentation. *Int. Immunol.*, 査読有,25:117-128,2013. doi: 10.1093/intimm/dxs096.

Tsukamoto H, Nagai Y. (10 人中 6 番目) Reduced surface expression of TLR4 by a V254I point mutation accounts for the low LPS responder phenotype of BALB/c B cells. *J. Immunol.*, 査読有,190:195-204, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1201047.

Honda H, Nagai Y. (10 人中 2 番目) Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor Toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner. *J. Leukoc. Biol.*, 査読有, 91:967-976, 2012. doi: 10.1189/jlb.0112038.

Nakamura T, Nagai Y. (13 人中 10 番目) Analysis of Trichophyton antigen-induced contact hypersensitivity in mouse. *J. Dermatol. Sci.*, 査読有,66(2):144-153, 2012. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.02.008.

Watanabe Y, Nagai Y.(21 人中 21 番目) The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes*. 査読有, 61(5):1199-1209, 2012. doi: 10.2337/db11-1182.

Nagai Y. (10 人中 1 番目) The RP105/MD-1 complex is indispensable for TLR4/MD-2-dependent proliferation and IgM-secreting plasma cell differentiation of marginal zone B cells. *Int. Immunol.*, 査読有, 24(6):389-400,

2012. doi: 10.1093/intimm/dxs040.

[学会発表](計 26 件)

Okamoto N, An antibiotics funiculosin derivative is a novel agonist of Toll-like receptor 4, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 11 日, 京都.

Honda H, Isoliquiritigenin Is a Potent Inhibitor of NLRP3 Inflammasome Activation and Diet-induced Adipose Tissue Inflammation, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 10 日, 京都.

Watanabe Y, Adipocyte-derived free fatty acids trigger IL-1 production by neutrophils in mouse adipose tissue, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 10 日, 京都.

Ikutani M, Roles of IL-5-producing ILC2 in vascular pathogenesis, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 10 日, 京都.

松本隼, 副腎白質ジストロフィーモデルマウスへの骨髄移植とその効果, 日本薬学会北陸支部第 126 回例会, 2014 年 11 月 16 日, 金沢.

松本隼, 副腎白質ジストロフィー: レンチウイルスベクターによる ABCD1 タンパク質の発現と骨髄移植, 第 56 回日本先天代謝異常学会総会, 2014 年 11 月 13-15 日, 仙台.

長井良憲, 遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症における好中球と IL-1 シグナルの機能解析, 第 35 回日本肥満学会, 2014 年 10 月 24 日, 宮崎.

Mizote K, Structural Determination and Synthesis of Isoprenoids as Immune Activators via TLR4/MD-2, SLB IEIIS 2014, 2014 年 10 月 23 日, Salt Lake.

松本隼, モデルマウスを用いた副腎白質ジストロフィーに対する骨髄移植の検討, 日本薬学会第 13 回次世代を担う若手フォーラム・バイオフォーラム 2014, 2014 年 9 月 20 日, 富山.

生谷尚士, IL-33 に誘導される血管壁肥厚と IL-5 産生 ILC2, 第 35 回日本炎症・再生医学会, 2014 年 7 月 1-4 日, 沖縄.

Watanabe Y, 3-adrenergic receptor-mediated lipolysis of adipocytes induces accumulation of large number of neutrophils and pro-inflammatory responses in mouse adipose tissue, 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 13 日, 千葉.

Yanagibashi T, The roles of IL-5 producing ILC2 in the intestinal immunity, 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 11 日, 千葉.

本田裕恵, 甘草成分は TLR4 及び NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する, 第 19 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2013 年 12 月 7 日, 滋賀.

松本隼, 副腎白質ジストロフィー: レンチウイルスベクターを用いた ABCD1 遺伝子発現と骨髄移植, 平成 25 年度日本薬学会北陸支部第 125 回例会, 2013 年 11 月 17 日, 石川.

溝手啓介, 自然免疫受容体 TLR4/MD-2 複合体の新規リガンド創製を目指したイソプレノイド脂質の構造解析と合成研究, 日本化学会秋季事業 第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2013, 2013 年 10 月 21 日, 東京.

長井良憲, メタボリック症候群における慢性炎症を制御する自然免疫シグナルの解析, 第 34 回日本肥満学会, 2013 年 10 月 11 日, 東京.

生谷尚士, 腸管免疫における IL-5 産生 ILC2 の役割の解明, 第 34 回日本炎症・再生医学会, 2013 年 7 月 2-3 日, 京都.

Watanabe Y, Regulatory mechanisms of Radioprotective 105/MD-1 expression in inflammatory macrophages in the adipose tissue. 第 78 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 第 21 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 合同学術集会, 2013 年 5 月 20 日, Tokyo.

Honda H, Isoliquiritigenin and glycyrrhizin inhibit the inflammasome activation in a different manner. The 100th Annual Meeting of The American Association of Immunologists(第 100 回アメリカ免疫学会), 2013 年 5 月 5 日, Honolulu.

Yanagibashi T, Characterization of innate IL-5-producing non-T cells in the large intestine regarding responsiveness to IL-33 and IgA production. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 7 日, 神戸.

②① Honda H, Isoliquiritigenin and glycyrrhizin, representative components of *Glycyrrhiza uralensis*, inhibit activation of NALP3 inflammasome. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 6 日, 神戸.

②② Ikutani M, Roles of lung innate IL-5-producing cells in antimetastatic activity through eosinophils. IEIIS2012 Homeostatic Inflammation Symposium, 2012 年 10 月 24 日, Tokyo.

②③ Nagai Y, Regulation of adipose tissue inflammation by TLR family protein RP105/MD-1. IEIIS2012 Homeostatic Inflammation Symposium, 2012 年 10 月 24 日, Tokyo.

②④ 長井良憲, TLR ファミリー分子 RP105/MD-1 は高脂肪食誘発性の肥満、脂肪組織炎症、インスリン抵抗性を制御する. 第 33 回日本炎症・再生医学会, 2012 年 7 月 5-6 日, 福岡.

②⑤ Watanabe Y, The radioprotective 105/MD-1 complex contributes to

diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. The 99th Annual Meeting of The American Association of Immunologists(第99回アメリカ免疫学会), 2012年5月7日, Boston, MA.

- ②⑥ Nagai Y., Potential roles for soluble MD-1 in disease progression of autoimmune prone MRLlpr/lpr mice. The 99th Annual Meeting of The American Association of Immunologists(第99回アメリカ免疫学会), 2012年5月7日, Boston, MA.

〔図書〕(計 3 件)

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志: 第4章 13節 RP105. 「series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患<下巻>」. 尾池雄一, 佐々木雄彦, 村上誠, 矢作直也編集, 133-142, 株式会社エルアイシー, 東京, 2015.

本田裕恵, 長井良憲, 高津聖志: 第6章 3植物由来成分による TLR4/MD-2 シグナルの抑制. エンドトキシン・自然免疫研究 17. 谷徹, 横地高志編集. 80-85, 医学図書出版株式会社, 東京, 2014.

Nagai Y., Takatsu K.: Section2. Part E. 26. Role of the immune system in obesity-associated inflammation and insulin resistance. In "Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity" (Ronald R. Watson), pp281-293, ELSEVIER/Academic Press, New York, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

名称: 「IL-1 及び TNF 活性阻害剤」

発明者: 高津 聖志, 平井 嘉勝, 長井 良憲, 松永 孝之

権利者: 国立大学法人富山大学、富山県薬事研究所

種類: 特許

番号: PCT 国際出願 (PCT-TU25-95)

出願年月日: 平成 26 年 12 月 24 日

国内外の別: 国外

名称: 「トール様受容体 4 活性化作用を有するフニコロシン誘導体及びその用途」

発明者: 藤本 ゆかり, 深瀬 浩一, 高津 聖志, 長井 良憲, 岡本 直樹

権利者: 国立大学法人大阪大学、国立大学法人富山大学、テイカ製薬株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2014-201593 (2013-203801 を基礎とする優先権主張出願)

出願年月日: 平成 26 年 9 月 30 日

国内外の別: 国内

名称: 「IL-1 及び TNF 活性阻害剤」

発明者: 高津 聖志, 平井 嘉勝, 長井 良憲, 松永 孝之

権利者: 国立大学法人富山大学、富山県薬事研究所

種類: 特許

番号: 特願 2013-271897

出願年月日: 平成 25 年 12 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: 「トール様受容体 4 活性化作用を有するフニコロシン誘導体及びその用途」

発明者: 藤本 ゆかり, 深瀬 浩一, 高津 聖志, 長井 良憲, 岡本 直樹

権利者: 国立大学法人大阪大学、国立大学法人富山大学、テイカ製薬株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2013-203801

出願年月日: 平成 25 年 9 月 30 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・客員准教授

研究者番号: 30431761