

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461386

研究課題名(和文) 肥満・糖尿病における免疫プロテアソームの役割の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the role of the immunoproteasome in obesity and diabetes

研究代表者

木村 博昭 (Kimura, Hiroaki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70593622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症は肥満病態に関わっているが、未知の点が多い。免疫プロテアソームサブユニットの一つであるLMP7は免疫システムにおいて重要で、自己免疫疾患の病態に關与する。肥満に炎症が関わることから、LMP7欠損マウスを利用して、肥満におけるLMP7の役割について検討した。LMP7欠損により、高脂肪食による肥満・内臓・皮下脂肪の蓄積、脂肪組織での炎症が抑制され、耐糖能も改善された。LMP7欠損は脂肪細胞分化を抑制し、M2マクロファージマーカーの発現を増強した。本研究により、血球系でも組織細胞でもLMP7が肥満病態に關与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic mechanism of inflammation in obesity is not fully understood. Low-molecular-mass polypeptide-7 (LMP7), a proteolytic subunit of the immunoproteasome, plays a critical role in the immune system, and has been involved in the pathogenesis of several autoimmune diseases. We investigated the role of LMP7 in high fat diet-induced obesity using LMP7-deficient mice. LMP7 deficiency decreased body weight gain and fat accumulation, suppressed macrophage infiltration in the adipose tissue, improved glucose sensitivity. LMP7 deficiency also suppressed adipogenesis, and increased gene expression of M2 macrophage markers in fat tissues. These findings demonstrate that LMP7 in both hematopoietic and non-hematopoietic cells contributes to the pathogenesis of obesity.

研究分野：Endocrinology and Immunology

キーワード：immunoproteasome obeisty LMP7 macrophages inflammation diabetes

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満症や糖尿病などの生活習慣病は、近年、先進国や新興国で顕著に増加している。そのため、生活習慣病の発病機構を解明する研究や、新規治療法・医薬品の開発をめざした研究は世界中で盛んに行われている。我が国でも、若年層も含めて患者数が増加しており、その予防・治療法の開発は喫緊の課題である。最近、内臓脂肪の蓄積と炎症が密接に関わり、生活習慣病の病態が発症することが報告されている。しかし、その全貌はまだ明らかではなく、予防・治療法の開発のため、詳細な発症機序の解明が求められている。

(2) 申請者は、米国留学時に内分泌器官である甲状腺自己免疫疾患の橋本病マウスモデルの病態を解析し、免疫プロテアソームが炎症状態及び甲状腺機能に関与することを見出した。帰国後、メタボリック症候群の病態に炎症が関与することに着目し、「慢性炎症」と「マクロファージ浸潤」という二つのキーワードを据えて、メタボリック症候群における免疫プロテアソームの役割について解析を始めた。

2. 研究の目的

メタボリック症候群の中で、内臓脂肪型肥満病態・糖尿病の病態に免疫プロテアソームが関与するかどうかを検討し、関与する場合、免疫プロテアソームがどのように病態に影響を及ぼすのか、その機構を明らかにすることを主要な目的とする。一般に、血球細胞での免疫プロテアソームの発現が顕著であることが知られているが、実際には、かなり多くの組織細胞でも、程度にばらつきがあるが、免疫プロテアソームが発現していることがわかっている。そこで、血球細胞と組織細胞のそれぞれの免疫プロテアソームの役割を解明することも目的とする。そして、これらの結果を統合して、最終的に免疫プロテアソームが肥満や糖尿病の予防や治療の標的となることを示し、新規治療法の開発につなげることを最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと免疫プロテアソームサブユニットのLMP7を欠損した雄マウスに、高脂肪食を投与し、肥満(体重増加)、血糖値・血中インスリン値の上昇、血清中総コレステロールや血清中トリグリセリド

の上昇、耐糖能、インスリン感受性、摂食量、CTによる皮下脂肪・内臓脂肪の増加、酸素消費量などを測定し、両者での差を比較する。

また、高脂肪食負荷 8 週間後に、マウスの血清、肝臓・精巣上体の内臓脂肪・腎周囲脂肪・腸間膜脂肪・下肢の皮下脂肪を採取し、それらの重量を測定する。膵臓・腎臓・褐色脂肪も臓器サンプルとして採取し、メタボ関連の分子や炎症関連の分子の遺伝子レベルでの発現とタンパク質レベルでの発現を解析する。主に炎症性サイトカインやケモカインの発現を real-time PCR、ウェスタンブロッティング、ELISA 等で定量し、野生型と LMP7 欠損マウスでの違いを検討する。

新鮮な臓器より、コラゲナーゼを使って細胞を分散させて、フローサイトメトリーによりどのような免疫細胞が存在し、野生型と免疫プロテアソーム欠損マウスとの違いを比較検討する。また、骨髄移植モデルを利用して、血球系と組織のどちらの免疫プロテアソームが病態発現に関与するかを上記の方法で検討する。

(2) 骨髄由来マクロファージを作製し、野生型と免疫プロテアソーム欠損で、分化や機能に差があるかどうかを比較検討する。

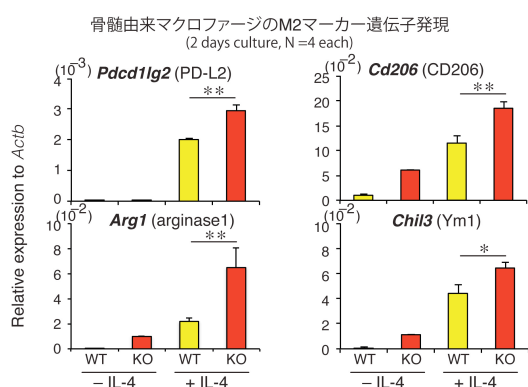
(3) 脂肪前駆細胞を鼠径部から採取し、脂肪細胞への分化能を検討する。また、脂肪前駆細胞株を遺伝子改変法で、免疫プロテアソームノックダウン細胞株を作製し、脂肪細胞への分化に影響があるかどうかを検討する。また、免疫プロテアソーム阻害剤による効果も検討する。

4. 研究成果

(1) 野生型と免疫プロテアソームのサブユニットの一つである LMP7 を欠損したマウスに高脂肪食を 8 週間投与した。摂食量・エネルギー消費量に差はなかったが、LMP7 の欠損により、体重増加、内臓脂肪(精巣上体・腸間膜・腎周囲)と下肢の皮下脂肪の蓄積は顕著に抑制された。血糖値・血中インスリン値や血清中の総コレステロール・中性脂肪の上昇も同様に抑制された。脂肪組織の炎症が抑制され、マクロファージの浸潤も抑制された。さらに炎症性アディポカインのレプチン値の上昇が抑制され、抗炎症性のアディポネクチンの

発現が増強された。また、脂肪組織中の炎症性 M2 マクロファージのマーカー遺伝子の発現が欠損マウスで増強された。また、骨髄移植モデルの結果から血球と組織の両方の免疫プロテアソームが重要であることがわかった。以上の結果は論文に発表された。

(2) 上記の結果を基に骨髄由来マクロファージを作製し、IL-4 で刺激し、M2 マクロファージへの分化能を検討した。LMP7 の欠損で M2 マーカーの遺伝子発現が増強された。(図参照)また、タンパク質レベルでも表面マーカーの発現を確認した。



(3) LMP7 欠損マウスの初代培養脂肪前駆細胞、LMP7 選択的阻害剤存在下の脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞、LMP7 を含む免疫プロテアソームを欠損した 3T3-L1 細胞で、脂肪細胞への分化が抑制されることを確認した。

(2) と (3) については、さらに研究を進めている。

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 14 件)

① Kimura H, **Karasawa T**, Usui F, Kawashima A, Endo Y, Kobayashi M, Sadatomo A, Nakamura J, Iwasaki Y, Yada T, Tsutsui H, Kasahara T, **Takahashi M**. Caspase-1 deficiency promotes high-fat diet-induced adipose tissue inflammation and the development of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(5):E881-E890. doi: 10.1152/ajpendo.00174.2016. 査読有

② Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushina Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hasebe N, Takahashi M. NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the

Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Sci Rep.* 2016;6:26489. doi: 10.1038/srep26489. 査読有

③ Kimura H, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Suzuki K, Iwasaki Y, Yada T, Caturegli P, Takahashi M. Immunoproteasome subunit LMP7 Deficiency Improves Obesity and Metabolic Disorders. *Sci Rep*, 2015, 5: 15883, doi: 10.1038/srep15883. 査読有

④ Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K. New insights into the function of the immunoproteasome in immune and non-immune cells. *J Immunol Res*, ID 541984, 2015. doi: 10.1155/2015/541984. 査読有

⑤ Komada T, Usui F, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Inoue Y, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Takahashi M. Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Sci Rep*, 2015; 5: 10901. doi: 10.1038/srep10901. 査読有

⑥ Shirasuna K, Karasawa T, Usui F, Kobayashi M, Komada T, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Taniguchi S, Takahashi M. NLRP3 deficiency improves angiotensin II-induced hypertension but not fetal growth restriction during pregnancy. *Endocrinology*, 2015; 156: 4281-4292. doi: 10.1210/en.2015-1408. 査読有

⑦ Karasawa T, Kawashima A, Usui F, Kimura H, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushina Y, Sagara J, Takahashi M. Oligomerized CARD16 promotes caspase-1 assembly and IL-1 β processing. *FEBS Open Bio*, 2015; 5: 348-356. doi: 10.1016/j.fob.2015.04.011. 査読有

⑧ Mizushina Y, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Kobayashi M, Komada T, Inoue Y, Mato N, Yamasawa H, Latz E, Iwakura Y, Kasahara T, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi M. NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1 β . *J Biol Chem*, 2015; 290(8): 5065-5077. doi: 10.1074/jbc.M114.603217. 査読有

⑨Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kimura H, Kawashima A, Mizukami H, Ohkuchi A, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Ozawa K, Taniguchi S, Takahashi M. Nanosilica-induced placental inflammation and pregnancy complications: Different roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC. *Nanotoxicology*, 2015; 9: 554-567. doi: 10.3109/17435390.2014.956156. 査読有

⑩Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Dezaki K, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Iwakura Y, Tsutsui H, Taniguchi S, Yanagisawa K, Yada T, Yasuda Y, Takahashi M. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *J Immunol*. 2014;192(9):4342-51. doi: 10.4049/jimmunol.1302039. 査読有

⑪Hara K, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Mizushina Y, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Matsuyama S, Kimura K, Takahashi M. Interferon-tau attenuates uptake of nanoparticles and secretion of interleukin-1 β in macrophages. *PLoS One*, 2014;9(12): e113974. doi: 10.1371/journal.pone.0113974. 査読有

⑫Komada T, Usui F, Shirasuna K, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Kusano E, Takahashi M. ASC in Renal Collecting Duct Epithelial Cells Contributes to Inflammation and Injury after Unilateral Ureteral Obstruction. *Am J Pathol*. 2014 184(5):1287-98. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.014. 査読有

⑬木村博昭: だれでもわかる甲状腺の基礎知識「甲状腺研究で使われるマウスの系統」 *日本甲状腺学会雑誌* 6(2), 138, 2015

〔学会発表〕(計 8件)

①木村博昭、唐澤直義、岩崎有作、矢田俊彦、高橋将文. 高脂肪食による肥満性炎症におけるCaspase-1の役割. 2017年3月24-27日、日本薬学会第137年会

②Hiroaki Kimura, Tadayoshi Karasawa, Tadashi Kasahara, Patrizio Caturegli, Masafumi Takahashi. New insights into the role of the immunoproteasome in inflammatory diseases. 第19回武田振興財団生命科学シンポジウム(慢性炎症: 機序と制御) 2017年1月20-21日、大阪府吹田市.

③Hiroaki Kimura, Tadayoshi Karasawa, Sachiko Watanabe, Yusaku Iwasaki, Toshihiko Yada, Patrizio Caturegli, Tadashi Kasahara, Masafumi Takahashi. New insights into the role of the immunoproteasome. 第13回自治医大国際シンポジウム. 2016年10月28日、栃木県下野市.

④木村博昭. 免疫プロテアソームの多彩な役割. 第15回自治医大シンポジウム. 2016年9月15-16日、栃木県下野市.

⑤木村博昭、唐澤直義、川島晃、臼井文武、笠原忠、鈴木幸一、高橋将文. 高脂肪食誘導型肥満における免疫プロテアソーム(LMP7)の役割. 第37回日本炎症・再生医学会. 2016年6月16-17日、京都市.

⑥木村博昭、臼井文武、唐澤直義、川島晃、笠原忠、鈴木幸一、岩崎有作、矢田俊彦、高橋将文. 高脂肪食による肥満・メタボリック病態における免疫プロテアソーム欠損の有益な効果. 第87回日本内分泌学会. 2016年4月23-25日、東京.

⑦木村博昭、臼井文武、唐澤直義、川島晃、笠原忠、鈴木幸一、Patrizio Caturegli、高橋将文. 高脂肪食による肥満におけるLMP7の役割. 第36回日本肥満学会学術集会. 2015年10月2-3日、名古屋

⑧木村博昭、川島晃、鈴木幸一、岩間信太郎、Patrizio Caturegli、高橋将文. LMP7欠損マウスの甲状腺異常. 第86回日本内分泌学会. 2014年4月24-26日、福岡市.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/inflammation/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 博昭 (KIMURA, Hiroaki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70593622

(2) 研究分担者

白砂 孔明 (SHIRASUNA Koumei)

東京農業大学・農学部・助教

研究者番号：20552780

臼井 文武 (USUI Fumitake)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50585560

(3) 連携研究者

高橋 将文 (TAKAHASHI Masafumi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40296108