

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08527

研究課題名(和文) 視床下部において炎症反応を惹起し、摂食異常を誘導する自然免疫シグナルの機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the innate immune signal that induces hypothalamic inflammation and feeding dysfunction

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)・客員教授

研究者番号：30431761

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)：高脂肪食摂餌により誘導される視床下部炎症及びレプチン抵抗性の発症について、TLRシグナル分子TRIFが重要な役割を果たすことを見いだした。In situ hybridization法により、視床下部にTRIFが発現することを確認した。高脂肪食摂餌またはTLR3の内因性リガンドStathminの脳室内投与による視床下部レプチンシグナルの減弱、摂餌量の減少がTRIF KOマウスで改善することを確認した。TLR3 KOマウスではTRIF KOマウスと同等の表現型を示さなかったことから、視床下部炎症やレプチン抵抗性の誘導におけるTRIFの上流は、TLR3以外の分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that a TLR signaling molecule TRIF had an important role in the pathogenesis of high-fat diet (HFD)-induced hypothalamic inflammation and leptin resistance. We demonstrated that TRIF was expressed in the hypothalamus of wild-type mice by in situ hybridization. In vivo analyses revealed that HFD- or an intrinsic TLR3 ligand Stathmin-induced inflammation and reduced leptin signaling in the hypothalamus were improved in TRIF-deficient mice compared with wild-type mice. However, TLR3-deficient mice showed different phenotypes from TRIF-deficient mice, suggesting that another molecule other than TLR3 may be responsible for TRIF-induced hypothalamic inflammation and leptin resistance.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 視床下部炎症 摂食異常 レプチン抵抗性

## 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、Toll-like receptor (TLR) シグナルのアダプター分子 TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-) が高脂肪食摂餌下において視床下部での炎症反応、レプチン抵抗性を誘導し、摂食異常及び肥満の発症に重要な役割を果たすことを、TRIF 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて新規に見出した。

以上から、視床下部炎症やレプチン抵抗性の発症における TRIF の機能を明らかにすることは、自然免疫系と神経系がクロストークする機序や、それが摂食異常を誘導する機序について、新たな知見の発見に繋がることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、視床下部において TRIF が炎症反応及びレプチン抵抗性を惹起するメカニズムを、分子・細胞・個体レベルで解明することを目的とした。具体的には以下の3項目について研究計画を進めた。1) 視床下部における TRIF 発現細胞の同定、2) 視床下部炎症、レプチン抵抗性を誘導する TRIF シグナル伝達経路の解明、3) TRIF の上流に位置する TLR と内因性リガンドの同定。

## 3. 研究の方法

(1) 視床下部における TRIF 発現細胞の同定：野生型 C57BL/6 マウス (WT マウス) の視床下部を採取し、TRIF 特異的プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法で解析した。

(2) 炎症反応、レプチン抵抗性を誘導する TRIF シグナル伝達経路の解明：(a) 炎症の惹起に関連したシグナル伝達分子 (JNK、I B- 等) の発現をウェスタンブロット法で測定した。普通食又は高脂肪食を摂餌した WT マウスより視床下部を採取し、高脂肪食により JNK、I B- のリン酸化が誘導されるかどうか解析した。(b) レプチン受容体下流の STAT3 リン酸化における TRIF シグナルの関与を解析した。WT マウス及び TRIF KO マウスに、普通食又は高脂肪食を摂餌させた後、カニューレを使用し、レプチンを脳室内に投与した。視床下部を採取し、STAT3 リン酸化をウェスタンブロット法で解析した。(c) 視床下部において、TLR3-TRIF シグナル経路が有効に機能するかどうかを検討するために、TLR3 の合成リガンドである二本鎖 DNA (poly (I:C)) を用いて解析した。WT マウス及び TRIF KO マウスに poly (I:C) を脳室内投与し、TRIF 依存性に視床下部炎症及びレプチン抵抗性が誘導されるか、解析した。

ウスに poly (I:C) を脳室内投与し、TRIF 依存性に視床下部炎症及びレプチン抵抗性が誘導されるか、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 等の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。レプチン抵抗性については、poly (I:C) 投与後、レプチンを脳室内投与し、摂餌量を測定すると共に、STAT3 リン酸化をウェスタンブロット法で解析した。

(3) TRIF 上流に位置する TLR と内因性リガンドの同定：(a) TLR3 KO マウスに普通食又は高脂肪食を摂餌させ、TRIF KO マウスと同様の表現型を示すか、以下の項目について解析した (体重増加、摂餌量、血清レプチン濃度、視床下部炎症、レプチン抵抗性)。 (b) TLR3 の内因性リガンドである Stathmin の発現を、WT マウスの視床下部においてリアルタイム PCR 法で測定した。(c) WT マウスに普通食又は高脂肪食を摂餌させ、高脂肪食により視床下部の Stathmin 発現が増加するか、リアルタイム PCR 法で解析した。(d) リコンビナント Stathmin を WT マウス及び TRIF KO マウスの脳室内に投与し、TRIF 依存性に視床下部炎症及びレプチン抵抗性が誘導されるか、解析した。

## 4. 研究成果

(1) 視床下部における TRIF 発現細胞の同定：ISH 法を用いて、WT マウスの視床下部における TRIF mRNA の発現を検討した。弱いながら TRIF の発現を認めた。WT マウスに高脂肪食を摂餌させ、視床下部における TRIF mRNA の発現が増加するか検討した。普通食摂餌マウスとの比較では、明らかな増加傾向は認めなかった。免疫組織染色法を用いて、視床下部における TRIF 発現細胞の同定を試みたが、シグナルが弱く、同定には至らなかった。今後、免疫組織染色法と ISH 法を組み合わせた二重染色で同定を試みる。

(2) 炎症反応、レプチン抵抗性を誘導する TRIF シグナル伝達経路の解明：(a) 高脂肪食の摂餌により、WT マウスの視床下部において JNK、I B- のリン酸化を認めた。(b) 普通食摂餌 WT マウスと比較して、高脂肪食摂餌 WT マウスでは、レプチン脳室内投与による視床下部の STAT3 のリン酸化が減弱していた。高脂肪食摂餌 TRIF KO マウスでは、この減弱が改善していた。すなわち、WT マウスの視床下部では高脂肪食によりレプチン抵抗性が認められ、TRIF KO マウスではこのレプチン抵抗性が改善していた。(c) poly (I:C) の脳室内投与により、WT マウス視床下部において炎症が誘導され、さらにレプチン抵抗性が誘導されることを確認した。TRIF KO マウスではこれらが改善していた。すなわち、視床下部において TLR3-TRIF シグナル経路は有効に機能し、このシグナル経路が視床下部炎症やレプチン抵抗性の誘導に重要であることが示唆された。

(3) TRIF 上流に位置する TLR と内因性リガンドの同定：(a) TLR3 KO マウスと TRIF KO マウス

スと比較した結果、TLR3 KO マウスと TRIF KO マウスは同じ表現型を示さず、TRIF KO マウスで認められる摂餌量の減少が、TLR3 KO マウスでは認められなかった。すなわち、視床下部炎症等の惹起に関わる TRIF シグナルの上流は、TLR3 ではないまたは TLR3 とそれ以外の分子が必要である可能性が示唆された。(b), (c) WT マウスの視床下部において、Stathmin mRNA の発現を認め、高脂肪食の摂餌により若干増加傾向を示した。(d) リコンビナント Stathmin の投与により、WT マウスにおいて視床下部炎症及びレプチン抵抗性が誘導された。これらが部分的に TRIF 依存的事であることを TRIF KO マウスを用いて明らかにした。

#### 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 14 件)

Wada T, Nagai Y. (15 人中 9 番目): Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. 査読有, *J. Endocrinol.*, Dec;235(3):179-191,2017.

doi:10.1530/J0E-17-0351

Yanagibashi T, Nagai Y. (5 人中 3 番目): Allergic diseases: From bench to clinic - Contribution of the discovery of interleukin-5. 査読有, *Cytokine*, 98:59-70,2017.

doi: 10.1016/j.cyto.2016.11.011

Okamoto N, Watanabe Y. (21 人中 5 番目) Nagai Y. (21 人中 20 番目): Funiculosin variants and phosphorylated derivatives promote innate immune responses via the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 complex. 査読有, *J Biol Chem.*, Sep 15;292(37):15378-15394,2017.

doi:10.1074/jbc.M117.791780

Nawaz A, Nagai Y. (26 人中 10 番目): CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. 査読有, *Nat. Commun.*, Aug 18;8(1):286,2017.

doi:10.1038/s41467-017-00231-1

Yamamoto S, Nagai Y. (25 人中 5 番目) Watanabe Y. (25 人中 16 番目): A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. 査読有, *Sci. Rep.*, Jun 20;7(1):3855,2017.

doi:10.1038/s41598-017-03994-1

Ikutani M, Nagai Y. (10 人中 8 番目): Prolonged activation of IL-5-producing ILC2 causes pulmonary

arterial hypertrophy. 査読有, *JCI Insight*. Apr 6;2(7):e90721,2017.

doi:10.1172/jci.insight.90721

Takikawa A, Watanabe Y. (24 人中 11 番目) Nagai Y. (24 人中 13 番目): HIF-1 in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. 査読有, *Diabetes*, Dec;65(12):3649-3659,2016.

doi:10.2337/db16-0012

Iida R, Nagai Y. (6 人中 4 番目): Fetal lymphoid progenitors become restricted to B-1 fates coincident with IL-7R expression. 査読有, *PLoS ONE*, Oct 28; 11(10):e0165676,2016.

doi:10.1371/journal.pone.0165676

Jennings RT, Watanabe Y. (20 人中 11 番目) Nagai Y. (20 人中 12 番目): Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. 査読有, *Int. Immunol.*, Oct;28(10):503-512,2016.

doi:10.1093/intimm/dxw031

長井良憲, 高津聖志: 自然免疫センサーによる炎症性マクロファージの制御と天然薬物による炎症制御. 査読無, 査読無, 週刊医学のあゆみ 第1土曜特集「代謝調節における免疫細胞の役割」Vol.257, No.6, 613-619,2016.

Nakamura T, Watanabe Y. (10 人中 6 番目) Nagai Y. (10 人中 7 番目): Glycyrrhetic acid inhibits contact hypersensitivity induced by trichophytin via dectin-1. 査読有, *Exp. Dermatol.*, Apr;25(4):299-304, 2016. doi:10.1111/exd.12931

Watanabe Y. (12 人中 1 番目) Nagai Y. (12 人中 2 番目): Isoliquiritigenin attenuates adipose tissue inflammation in vitro and adipose tissue fibrosis through inhibition of innate immune responses in mice. 査読有, *Sci. Rep.*, Mar 15;6:23097, 2016.

doi:10.1038/srep23097.

Takikawa A, Nagai Y. (16 人中 12 番目): Deletion of SIRT1 in myeloid cells impairs glucose metabolism with enhancing inflammatory response to adipose tissue hypoxia. 査読有, *Diabetology International*, March 7:59-68,2016.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13340-015-0213-3>

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志: 自然免疫系センサーによる慢性炎症制御とメタボリック症候群. 査読無, 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患「慢性炎症制御による加齢関係疾患治療の展望」第4巻第2号, 67-72,2015.

[学会発表](計 17 件)

本田裕恵, 渡邊康春, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 平井嘉勝, 高津聖志. 糖尿病モデルマウスの内臓脂肪組織に対するイソリクイリチゲニンの抗炎症・抗線維化作用の解析, 日本薬学会 第 138 年会, 2018 年 3 月 26 日, 金沢.

Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K. IL-5-producing ILC2s in the large intestine contribute to T cell-independent IgA production through the regulation of eosinophil homeostasis, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017 年 12 月 14 日, 宮城.

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. The interaction of neutrophils with adipocytes plays a key role in the infiltration of macrophage into the adipose tissue, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017 年 12 月 12 日, 宮城.

Nagai Y, Okamoto N, Takatsu K. Funiculosin variants and their synthetic derivatives are novel agonists for murine and human TLR4/MD-2 complex: Potential reagents for developing vaccine adjuvants, Innovation Forums Basel Life 2017, 2017 年 9 月 11-13 日, Basel, Switzerland.

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Adipose tissue neutrophils are primed by the interaction with adipocytes, 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016 年 12 月 7 日, 沖縄.

Okamoto N, Honda H, Akashi-Takamura S, Nagai Y, Takatsu K. Agonistic effects of synthetic derivatives of funiculosin on mouse/human TLR4/MD-2, 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016 年 12 月 5 日, 沖縄.

大山拓郎, 富田勇, 螺澤太郎, 松本隼, 守田雅志, 渡辺志朗, 渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志, 山本誠二, 石井陽子, 笹原正清, 今中常雄. 骨髄移植による副腎白質ジストロフィー 発症抑制機構の解明: レシピエントマウスの生化学的解析, 第 128 回薬学会北陸支部会, 2016 年 11 月 27 日, 石川.

渡邊康春, 長井良憲, 本田裕恵, 高津聖志. 天然薬物イソリクイリチゲニンは自然免疫系に作用し、内臓脂肪組織の線維化を抑制する, 第 37 回日本肥満学会, 2016 年 10 月 8 日, 東京.

本田裕恵, 渡邊康春, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 平井嘉勝, 高津聖志. 甘草成分イソリクイリチゲニンは内臓脂肪組織の炎症・線維化を抑制する, 日本生薬学会第 63 回年会, 2016 年 9 月 25 日, 富山.

渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志, TLR のアダプター分子 TRIF を介した視床下部

炎症と摂食制御異常の解析, 第 37 回日本炎症・再生医学会, 2016 年 6 月 17 日, 京都.

本田裕恵, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 渡邊康春, 常山幸一, 林宏明, 藤井勲, 平井嘉勝, 高津聖志. 甘草成分イソリクイリチゲニンは NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害し、2 型糖尿病の慢性炎症を改善する, 日本薬学会 第 136 年会, 2016 年 3 月 29 日, 横浜.

Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K. Role of IL-5-producing ILC2s in T cell independent-IgA production in the large intestine, 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015 年 11 月 18 日, 札幌.

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Accumulation of and increased IL-1 production by neutrophils in adipose tissue: roles of free fatty acid and leukotriene B4, 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015 年 11 月 18 日, 札幌.

渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志, 遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症における好中球の機能解析, 第 36 回日本肥満学会, 2015 年 10 月 3 日, 名古屋.

Okamoto N, Nagai Y, Kawashima H, Fukui R, Miyake K, Kobayashi Y, Takatsu K. A compound derived from Psoralea glandulosa L. is a novel inhibitor of Toll-like receptor 7, Basel Life Science Week 2015, 2015 年 9 月 23 日, Basel, Switzerland.

生谷尚士, 常山幸一, 中江進, 有田誠, 長井良憲, 高津聖志. IL-33 誘発性血管肥厚における IL-5 産生 ILC2 と好酸球の役割, 第 36 回日本炎症・再生医学会, 2015 年 7 月 21 日, 東京.

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志. 遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症モデルにおける好中球と IL-1 の機能解析, 第 36 回日本炎症・再生医学会, 2015 年 7 月 21 日, 東京.

〔図書〕(計 3 件)

Nagai Y, Watanabe Y, Honda H, Takatsu K: Chapter 8 Isoliquiritigenin: A unique licorice component that attenuates adipose tissue inflammation and fibrosis by targeting the innate immune sensors. In “Biological activities and action mechanisms of licorice ingredients” (ed. H. Sakagami), InTech, Zagreb, pp. 121-134 ( ISBN 978-953-51-3119-9 ), 2017.

宮本朋美, 長井良憲, 高津聖志: 第 3 章 6.5 天然物由来アジュバント, 次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価, 石井健監修, シーエムシ

ー出版, 東京, 2017.  
Nagai Y, Honda H, Watanabe Y, Takatsu K.: Chapter 30 Potential therapeutic natural products for the treatment of obesity-associated inflammation by targeting TLRs and inflammasomes. In "Chronic Inflammation -Mechanisms and Regulation-" (M. Miyasaka and K. Takatsu), pp. 379-397, Springer Japan, Tokyo, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: トール様受容体 7 またはトール様受容体 9 の活性化阻害剤  
発明者: 高津聖志, 長井良憲, 岡本直樹, 小林雄一, 藤下繁人  
権利者: 国立大学法人富山大学, 国立大学法人東京工業大学, テイカ製薬株式会社  
種類: 特許 PCT 国際出願 (特願 2015-184215 を基礎とする PCT 国際出願)  
番号: PCT/JP2016/0077496  
出願年月日: 平成 28 年 9 月 16 日  
国内外の別: 国外

名称: 自然免疫を活性化する粘膜ワクチン用アジュバント  
発明者: 高津聖志, 松永孝之, 宮本朋美, 本田裕恵, 柳橋努, 長井良憲, 生谷尚土, 渡邊康春, 刈米アイ  
権利者: 富山県, 国立大学法人富山大学, 一般財団法人阪大微生物病研究会, 一般財団法人化学及血清療法研究所, デンカ生研株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-072240  
出願年月日: 平成 28 年 3 月 31 日  
国内外の別: 国内

名称: トール様受容体 7 またはトール様受容体 9 の活性化阻害剤  
発明者: 高津聖志, 長井良憲, 岡本直樹, 小林雄一, 藤下繁人  
権利者: 国立大学法人富山大学, 国立大学法人東京工業大学, テイカ製薬株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-184215  
出願年月日: 平成 27 年 9 月 17 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: インフラマソーム活性制御剤  
発明者: 高津聖志, 平井嘉勝, 長井良憲, 本田裕恵, 松永孝之

権利者: 富山県, 国立大学法人富山大学  
種類: 特許  
番号: 特許第 6036193 号  
取得年月日: 平成 28 年 11 月 11 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
研究室ホームページ  
<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)・  
客員教授  
研究者番号: 3 0 4 3 1 7 6 1

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

渡邊 康春 (WATANABE, Yasuharu)  
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: 8 0 6 4 6 3 0 7