

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350123

研究課題名(和文) 食生活の偏りが脂肪炎症関連疾患に及ぼす影響と腸内細菌叢の関わりについて

研究課題名(英文) Effects of deviated food habit on diseases with adipose inflammation, and their association with intestinal microflora

研究代表者

有持 秀喜 (ARIMOCHI, Hideki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：30311822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食生活の乱れが、脂肪炎症が関与する疾患にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、ヒトの脂肪萎縮を伴う自己炎症性疾患の原因タンパクであるPSMB8を欠損したマウスに高脂肪食を与えた。その結果、欠損マウスは脂肪量が少なく、体重増加も悪かった。欠損マウスの脂肪前駆細胞は脂肪組織中の数が少なく、成熟に必要な遺伝子の発現も低かった。脂肪組織中での炎症性サイトカインの発現や浸潤細胞の数は、野生型マウスとの間に顕著な差は見られなかった。これらの結果は、PSMB8は脂肪細胞の成熟に必要であること、および、この分子の欠損は高脂肪食による脂肪炎症に大きな影響を与えないことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：To determine the correlation between deviated food habit and diseases with adipose inflammation, Psmb8-deficient mice were fed a high fat diet (HFD). The PSMB8 is reported as a causal gene for human autoimmune disease with lipodystrophy. Psmb8-deficient mice treated with HFD showed lower gain of body weight, less amount of fat tissue, and smaller number of preadipocyte in their fat tissue than that of WT mice with HFD. The Psmb8-deficient preadipocyte also had low expression levels of genes need for adipocyte maturation. Expression levels of inflammatory cytokines and number of infiltrated cells in the adipose tissue of HFD-treated mice were not significant differences between the Psmb8-deficient and -sufficient mice. These results may suggest Psmb8 molecule were necessary for development of adipose tissue, and did not affect to inflammation in mouse adipose tissue induced by HFD treatment.

研究分野：免疫学、細菌学

キーワード：脂肪炎症 腸内菌 免疫プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では、食生活が従来の日本型からアメリカ型に移行しつつあり、ファーストフードやジュースなどの過食による脂肪、蔗糖の摂取過多、野菜不足による食物繊維の不足など、いわゆる食生活の偏り、乱れが起きているのと同時に、アレルギー疾患や癌、炎症性腸疾患など、免疫系が重要な役割を果たしている病気が増加している。このような病気の発症には原因遺伝子などの内的要因と衛生環境やストレスなどの外的要因が複雑に絡み合っていると考えられ、食生活の乱れによる腸内環境の悪化が免疫系のバランスを崩すことはその原因の一つと考えられている。食事成分を消化、吸収する腸管は、腸管上皮細胞どうしを強固に結びつけ、粘液を分泌することで食物由来の異物や腸内菌の侵入を防ぐ仕組みを発達させている。腸内菌は、ヒトに必要なビタミンや大腸粘膜の栄養源となる短鎖脂肪酸を合成し、ヒトとの間に共生関係を保っている。さらに、腸管は全身のリンパ球の60%以上が集中する最大の免疫器官であり、腸上皮細胞に囲まれた上皮間リンパ球、パイエル板、粘膜固有層などが相互に関連して機能している。そして、腸内菌が全く存在しない無菌動物では腸管免疫の重要な器官であるパイエル板が小さく、腸液中に分泌されるIgAの産生も著しく低いが、腸管内に細菌が住み始めると正常な免疫系が作り上げられることが知られている。また、腸内菌によって代謝産物として産生されるATPが炎症性サイトカインの産生に関わるTh17を分化誘導することなどから、免疫系の正常な発達、維持には腸内菌が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

ヒトの腸内菌叢は食事、加齢、運動、ストレス、感染症、抗生物質の服用など様々な要因に影響を受ける。同じ遺伝的背景を持つ一卵性双生児であっても、食生活が異なる環境で暮らすと腸内菌叢の構成が違っているこ

とが分かっている。そして外的要因による腸内菌叢の変化は免疫に関する疾病の病状を変化させる場合がある。CD4陽性Tリンパ球は抗原刺激の種類によりTh1またはTh2という2種類の細胞に分化し、両細胞のバランスの偏りが自己免疫疾患やアレルギーの発症に寄与していると考えられている。ヨーグルトに含まれているラクトバチルス菌はTh1細胞を誘導することでアレルギーを抑制すると考えられており、非アレルギー児にはアレルギー児に比べてこの菌が多いことが報告されている。また、関節炎を起こすマウスに抗生物質を投与すると関節炎が抑えられることが知られている。つまり、食生活は腸内菌叢に変化を与える重要な要因であり、腸内菌と免疫の間には密接な関係があることが示唆される。しかし、食生活の偏りが腸内菌叢の乱れを引き起こし、免疫系のバランスを崩していると推測されるものの、食生活の偏りや腸内菌叢の変化がどのように免疫疾患の発症に寄与しているかの分子基盤は明らかではない。申請者のグループでは免疫プロテアソームを構成する*PSMB8*遺伝子の変異が脂肪萎縮と自己炎症性疾患を特徴とするJASLを引き起こすこと、および*PSMB8*遺伝子産物は脂肪細胞の成熟化に必要であることを報告した。これらの結果は*PSMB8*遺伝子産物が脂肪組織での炎症反応に関与していることを示唆しているが、詳細な機序は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では食生活の乱れのうち、脂肪の過剰摂取がどのように脂肪組織での炎症惹起に寄与するかを解明し、さらに*PSMB8*遺伝子産物が食生活の乱れに依存する脂肪炎症にどのように機能するのかを明らかにすることを研究目的とする。そして、これらの病態を悪化させる現象が見られた場合、腸管内容物中や腸粘膜中の腸内菌叢の関連性を明らかにする。これらの実験を行うことで、脂肪

の過剰摂取が脂肪炎症の程度に変化を与えるのかどうか、その変化に *PSMB8* 遺伝子産物や腸内菌叢の変化がどのように関与しているのかを生体、細胞、および分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食投与実験

8 週齢のマウスに普通食（オリエンタル酵母工業、MF diet）もしくは高脂肪食（オリエンタル酵母、HFD-60）を 26 週間与え、体重を週 2 回測定した。空腹時血糖は、1 晩絶食させた後の血糖値を Glucose Pilot blood glucose test strip (Obelis) を用いて測定した。インスリン抵抗値は 0.75 U/kg のインスリンを腹腔内に投与してから経時的に血糖値を測定することで求めた。投与最終日に CT を用いて筋肉量と脂肪量を測定した。屠殺したマウスから内臓脂肪を回収し、組織切片を作成後、HE 染色で脂肪細胞の大きさを測定した。脂肪組織をコラゲナーゼ処理して浸潤細胞や脂肪前駆細胞、未熟な脂肪細胞を含む stromal vascular fraction (SVF) を回収し、総細胞数を求めるとともに、フローサイトメトリーを用いて各種細胞を染め分けることで各細胞の割合を求めた。

(2) マウス脂肪細胞の成熟化に関する実験

マウスの脂肪組織より回収した SVF、および 3T3-L1 マウス脂肪前駆細胞を *in vitro* で培養し、confluent になった 2 日後にデキサメタゾン、3-isobutyl-1-methyl-xanthine、インスリンを加えて 2 日間培養し、その後インスリンを含む培地に交換してから 1 週間培養し、油滴を含んだ脂肪細胞に分化させた。分化誘導した細胞にオイルレッド O を取り込ませ、取り込まれた色素量を定量することで、脂肪分化を数値化した。*PSMB8* 遺伝子産物の特異的阻害剤として ONX0914 を、一般的なメンエキプロテアソーム阻害剤として MG132 を用いた。脂肪由来の SVF や 3T3-L1 細胞より

調製した cDNA を用いて qPCR を行った。ユビキチン化タンパクの検出は、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことで検出した。

(3) 脂肪炎症に関する実験

マウスの脂肪組織から cDNA を調製し、qPCR を行うことで炎症性サイトカインの発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食投与実験

普通食を与えた野生型マウスおよび *PSMB8* 遺伝子欠損マウスでは、体重の変化は遺伝子型の違いによって差が見られなかったが、高脂肪食を与えた場合、体重増加の割合が *PSMB8* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比較して小さいことが明らかとなった。マウス体内の脂肪量および筋肉量を測定したところ、筋肉量は各群で差がなかったが、脂肪量に関しては内臓脂肪、皮下脂肪ともに *PSMB8* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比較して少なく、高脂肪食を与えてもこの傾向は変わらなかった。内臓脂肪および皮下脂肪を構成する細胞の大きさを比較すると、*PSMB8* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて小さくなっていることが明らかとなった。脂肪炎症では組織内に浸潤した CD8 陽性 T 細胞が重要な役割を果たす。そこで、内臓脂肪に浸潤した細胞数を計測したところ、高脂肪食を投与すると普通食投与群と比べて浸潤細胞数が増える傾向が見られ、どちらの餌でも *PSMB8* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて細胞数が少ないことがわかった。しかし、浸潤細胞における CD8 陽性 T 細胞の割合は遺伝子型の違いによって差が見られなかった。空腹時血糖値は高脂肪食の投与で増加する傾向が示されたが、遺伝子型による違いは見られず、高脂肪食投与時のインスリン抵抗性についても遺伝子型による差は見られなかった。これらの結果は、*PSMB8*

分子の欠損は高脂肪食投与時に見られる脂肪の増加に影響を与えるが、脂肪炎症や糖代謝に関しては大きな影響を与えない可能性が示唆された。

(2) マウス脂肪細胞の成熟化に関する実験

PSMB8 遺伝子産物が脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化・成熟に与える影響を調べた。*PSMB8* 遺伝子欠損マウスでは内臓脂肪中の脂肪前駆細胞数および未成熟脂肪細胞数が少ないことが分かった。内臓脂肪の脂肪前駆細胞を *in vitro* で成熟細胞に分化誘導すると、*PSMB8* 遺伝子欠損マウス由来の細胞では野生型に比べて成熟化能力が減弱していることが明らかとなった。さらに脂肪細胞の成熟化に働く PPAR や Fabp4、Adiponectin、C/EBP の遺伝子発現量を調べると、*PSMB8* 遺伝子欠損マウス由来細胞では低下していることが明らかとなった。マウスの脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞を *in vitro* で成熟細胞に分化誘導する際、*PSMB8* の特異的阻害剤を添加すると分化が阻害された。そして PPAR や Fabp4、Adiponectin、C/EBP の発現も抑制された。一般的な免疫プロテアソーム阻害剤を添加した場合でも、3T3-L1 細胞の脂肪分化は阻害された。*PSMB8* の特異的阻害剤を添加した 3T3-L1 細胞ではコピキチン化タンパクの蓄積が確認できた。しかし、TNF の発現は上昇していなかった。これらの結果は、*PSMB8* 遺伝子産物が脂肪細胞の分化、成熟化に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(3) 脂肪炎症に関する実験

内臓脂肪における TNF の発現は、高脂肪食を与ええると、*PSMB8* 遺伝子欠損型と比較して野生型で有意に上昇していた。内臓脂肪における IL-6 の発現は、普通食では野生型よりも *PSMB8* 遺伝子欠損型の方が高かった。MCP-1 の発現については、内臓脂肪について

も皮下脂肪についても、野生型の方が高く、この傾向は食餌を変えても見られた。内臓脂肪より stromal vascular fraction を分離してフローサイトメトリー解析を行ったところ、F4/80 陽性 CD11b 陽性のマクロファージの割合が、高脂肪食を与えた場合には *PSMB8* 遺伝子欠損型の方が野生型よりも多い傾向を示した。これらの結果は、*PSMB8* 遺伝子産物の欠損はマクロファージの浸潤を促進するかもしれないが、脂肪全体の炎症誘導には大きな影響を与えないかもしれないことを示唆している。

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 1 件)

Hideki Arimochi、Yuki Sasaki、Akiko Kitamura、Koji Yasutomo. Differentiation of preadipocytes and mature adipocytes requires *PSMB8*. Scientific Reports. 査読有. 6 巻 2016 年. doi:10.1038/srep26791

[学会発表](計 1 件)

Hideki Arimochi、Dysfunction of *PSMB8* suppresses the maturation and anti-bacterial responses of adipocytes、第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年 12 月 5 日~2016 年 12 月 7 日、沖縄コンベンションセンター、ラグーナガーデンホテル(沖縄県宜野湾市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有持 秀喜 (ARIMOCHI, Hideki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：30311822