

平成 30 年 6 月 15 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：15K09410

研究課題名(和文) 雌性の制御性T細胞の機能と組織分布に関わる分子機構の解明に基づく代謝改善法の確立

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy against obesity-associated chronic inflammations based on the mechanism involved in sex-specific difference of Treg localization in adipose tissue.

研究代表者

和田 努 (Wada, Tsutomu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・講師

研究者番号：00419334

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)：Tregは肥満に伴う内臓脂肪(VAT)の慢性炎症を抑制する。我々は肥満マウスのVATにおいて、雄性では減少するTregが雌性では増加することを見出した。そこでT細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウス(KO)を作製し解析した。KOのTregは免疫抑制能を有するが、エストラジオール(E2)による抑制能への影響は低下していた。KOは食事性肥満と妊娠糖尿病病態下でのTregのVAT局在が低下し慢性炎症の増悪を認めたが、糖代謝への影響は軽度であった。Tregの脂肪組織局在に関わるケモカインシグナルの関与が明らかになり、これらの制御による脂肪組織慢性炎症抑制の治療戦略に向けた基礎的な基盤成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg) is known to attenuate obesity-associated chronic inflammation in the visceral adipose tissue. In contrast to the decreased of adipose Treg in male obese mice, we found that adipose Treg was increased in the visceral adipose tissue of female obese mice. Based on the fact, we constructed T cell specific estrogen receptor deficient mouse (KO). Female KO mice showed a decrease of adipose Treg with mild exacerbation of chronic inflammation on high-fat diet or under condition with gestational diabetes, although the impact on glucose metabolism was not severe. In this study, we found several signals related to the localization of Treg in adipose tissue. These results shed a new insight for understanding of the fundamental knowledge for treatment of insulin resistance in obesity by the regulation of chronic inflammation in obese adipose tissue.

研究分野：代謝学

キーワード：Treg 性差 代謝 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

内臓肥満によるメタボリックシンドロームはインスリン抵抗性を背景とし、多彩な代謝障害を誘導することで動脈硬化の進展を促進する。その結果、ヒトの寿命や生活の質に重大な影響を及ぼすことから、本病態の更なる解明と、より効果的な対策の開発が求められている。

非肥満の脂肪組織では、抗炎症性の Treg や M2-マクロファージ(M₂)が優位に局在し、免疫学的な恒常性が維持されている。一方高脂肪食負荷(HFD)により肥大化した内臓脂肪では Treg は減少し、M1-M₂ やリンパ球などの炎症性免疫細胞が増加することで慢性炎症が増悪し、インスリン抵抗性による糖脂質代謝の悪化が導かれる。肥満マウスに Treg を移植すると脂肪組織の慢性炎症が抑制され、糖代謝が改善することから、脂肪組織での Treg 減少は肥満に伴う慢性炎症進展の1つの機序として認識されている。

肥大化脂肪組織における Treg の増減や機能に関わる分子メカニズムに関しては、レプチンが Treg 分化を抑制することの他、不明な点が多かった。また、マウスを用いた脂肪組織の慢性炎症に関する報告の多くは雄性マウスでの検討であり、雌性での肥満病態は未解明な点が多い。

有経女性はエストラジオール(E2)の恒常性維持機能により、エネルギー代謝、糖脂質代謝の悪化から保護されている。しかし女性は閉経後、内臓脂肪が蓄積しやすく2型糖尿病の発症リスクも増大する。一方、妊娠末期の高濃度のE2はインスリン抵抗性を助長し、妊娠糖尿病病態に関わると考えられる。またE2はTregの分化増殖を促進し、妊娠中に必要な胎児への免疫寛容に寄与するが、この機構の障害は不育症の一因となることが知られている。しかし、E2の免疫制御を介した糖代謝調節に関し、E2により誘導されたTregが脂肪組織の慢性炎症や全身の糖代謝に及ぼす影響は未知である。

2. 研究の目的

雌性マウスでは、雄性マウスと異なり高脂肪食負荷(HFD)により肥満を呈しにくく、またその際内臓脂肪の Treg は雄性で減少するのに対し、雌性では逆に増加することを認めた。我々は、この Treg 脂肪組織局在に、E2 の作用が関与すると考え、以下の検討を行った。卵巣摘出(OVX)したマウスに 12 週間 HFD を給餌した閉経モデルマウスの代謝表現型および脂肪組織慢性炎症への影響を検証し、糖尿病治療薬である DPP4 阻害剤投与による改善効果を検証する。雌雄のマウスに同時に高脂肪食負荷を行い、脂肪組織 Treg

局在の差異を明らかにする。本検討では、雌性では OVX マウスに E2 を投与する群を設け、Treg の脂肪組織局在化にかかわる E2 の効果および Treg 局在シグナルを検証する。

③ T 細胞特異的 ERα 欠損マウス(TKO)を作製し、本マウスに HFD を負荷して T 細胞に対する E2 作用が欠如した際の肥満病態における代謝表現型を検討する。雌性の TKO マウスを用いた妊娠糖尿病モデルマウス(GDM)を作製し、その代謝表現型、Treg の内臓脂肪局在、ならびに内臓脂肪の慢性炎症を精査する。

3. 研究の方法

実験 雌性の C57BL/6 マウスを通常食群、閉経肥満群(OVX+HFD)、閉経群に DPP4 阻害剤を投与した群を作製し、12 週間の食事負荷ののちに代謝表現型を解析した。

実験 雄性 C57BL/6 を通常食及び HFD 負荷群に分け、また雌性 C57BL/6 マウスを通常食群、HFD 負荷群、閉経肥満群(OVX+HFD)、E2 投与群(OVX+HFD 群に E2 補充)に分け、16 週間の高脂肪食負荷ののち代謝表現型及び内臓脂肪の Treg 局在を検討する。またセルソーターを用いて Treg を分取しその解析から、内臓脂肪への Treg 局在に関わる遺伝子発現を検討する。

実験 CD4-Cre, ERα-flox マウス(T 細胞特異的 ERα 欠損マウス; TKO)を作製し、HFD 負荷を行ない、代謝表現型を解析する。

実験 雌性の TKO マウスおよび ERα flox マウス(FL)(いずれも C57BL/6 背景)を 4 週間の HFD 負荷ののちに雄性の BALB/c と交配し、GDM マウスを作製した。妊娠マウスを KO-GDM 群、FL-GDM 群とし、非妊娠の KO-NP 群、FL-NP 群と糖代謝を比較検討し、E18.5 に解剖し、脂肪組織、子宮、所属リンパ節、脾臓などの Treg 数などを解析した。

4. 研究成果

実験 の成果：閉経肥満群はエネルギー代謝の低下に伴う肥満を呈し、HFD 負荷群と比較しても耐糖能の顕著な悪化と脂肪組織慢性炎症の進展を認めた。閉経肥満群に対する DPP4 阻害剤テネリグリブチンの投与は、E2 低値にも関わらずエネルギー消費低下の回復を認め、肥満と慢性炎症の軽減を示した。以上より、テネリグリブチンは閉経肥満病態を適切に改善する効果的な抗糖尿病治療薬である可能性が示された。

実験 の成果：雄性マウスは HFD 負荷に伴い内臓脂肪の CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg が減少するのに対し、雌性では HFD 負荷により逆に内臓脂肪の Treg 数の増加を認めた。一方、OVX を行い性ホルモンを枯渇させた場合には、HFD 負荷による内臓脂肪 Treg の増

加を認めなかった。閉経肥満マウスに対し、性周期を模して4日に1回E2を皮下投与することでE2のみを補充するマウスを作製して検討したところ、本マウスはSham手術のみを行いHFD負荷したマウスとほぼ同等の体重推移と耐糖能を示し、生理的なE2補充モデルを確立した。本E2補充モデルでは、HFD負荷群と同等の内臓脂肪Treg数の増加を認め、E2が雌性でのTreg局在に重要な作用を示すと考えられた。またFOXP3の核内染色を行うとその後の遺伝子解析が困難なことから、CD4⁺CD25⁺T細胞をTreg-richな分画として遺伝子解析を行い、脂肪組織へのTreg局在化に関わる可能性のあるシグナルを見出した。

実験 TKOはFLと比較し雌雄とも体重、摂食量エネルギー代謝、脾臓のTreg数に変化を認めなかった。またHFD負荷を行い解析した結果、内臓脂肪におけるTreg数はKOで減少し、M1マクロファージの指標であるCD11c発現の増加を認めたが、これらの変化はマウス個体の糖代謝には影響を及ぼさなかったことから、生理的濃度のE2条件下において、T細胞のERαシグナルはTregの分化増殖や糖代謝に影響を及ぼさないことが明らかになった。

実験 現在までにGDMマウスの作製法を確立し、GDMマウスが非妊娠マウスに比べ耐糖能とインスリン感受性の悪化を示すことを確認している。GDM病態作製モデルにおいて、TKOはFLと比較し妊娠しにくく、本報告書を提出する時点では、実験の検討は終了していないが、検討を継続し論文として報告する予定である。

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)

- 1) Wada T, Sameshima A, Ito T, Kashimura A, Sawakawa K, Yonezawa R, Tsuneki H, Ishii Y, Sasahara M, Saito S, Sasaoka T. Teneligliptin improves metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. J Endocrinol. 2015 Oct;227(1): 25-36.

その他、Tregの性差に関する検討、およびT細胞特異的ERα欠損マウスの成績について、論文執筆中および追加検討中であり、まとめ次第それぞれを学術論文として発表予定である。

[学会発表](計8件)

- 1) 石川明香里、和田 努、伊藤哲生、王生

美沙、田中智子、齋藤 滋、恒枝宏史、笹岡利安 . エストロゲンが雌性肥満マウスの脂肪組織における制御性T細胞局在に与える影響 . 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 ; 2018 May 24-26 ; 東京 .

- 2) 田中智子、和田 努、伊藤哲生、王生美沙、宇埜生美恵、荻原沙季、石川明香里、鮫島 梓、恒枝宏史、齋藤 滋、笹岡利安 . CD4⁺T細胞特異的ERα欠損マウスに対する高脂肪食負荷が脂肪組織慢性炎症におよぼす影響 . 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 ; 2018 May 24-26 ; 東京 .
- 3) 和田 努、伊藤哲生、王生美沙、宇埜生美恵、鮫島 梓、田中智子、齋藤 滋、恒枝宏史、笹岡利安 . 肥満病態における制御性T細胞の性特異的な脂肪組織局在が糖代謝に及ぼす影響 . 第60回日本糖尿病学会年次学術集会 ; 2017 May 18-20 ; 名古屋 .
- 4) 王生美沙、和田 努、伊藤哲生、宇埜生美恵、恒枝宏史、鮫島 梓、齋藤 滋、笹岡利安 . 制御性T細胞の性特異的な脂肪組織局在が肥満に伴う慢性炎症と糖代謝に及ぼす影響 . 第16回日本内分泌学会北陸支部学術集会 ; 2016 Oct 22 ; 金沢 .
- 5) 和田 努 . エストロゲンの制御性T細胞を介した糖代謝およびインスリン感受性維持機構の解明 . Toyama Science GALA 2016 ; 2016 Sep 30 ; 富山 .
- 6) Sameshima A, Wada T, Yonezawa R, Sasaoka T, Saito S. Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin on glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. 68th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology; 2016, Apr 21-24; Tokyo.
- 7) 伊藤哲生、和田 努、櫻村彩香、王生美沙、恒枝宏史、鮫島 梓、齋藤 滋、笹岡利安 . 制御性T細胞の性特異的な脂肪組織局在が肥満に伴う慢性炎症と糖代

謝に及ぼす影響 . 日本薬学会北陸支部第
127 回例会 ; 2015 Nov 15 ; 富山 .

- 8) Sameshima A, Wada T, Ito T, Kashimura A,
Yonezawa R, Tsuneki H, Sasaoka T. Effects
of teneligliptin on glucose and energy
metabolism in a mice model of
postmenopausal obesity. American Diabetes
Association (ADA) 75th Scientific
Sessions; 2015 Jun 5-9; Boston, U.S.A.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

和田 努 (WADA, TSUTOMU)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
講師
研究者番号 : 00419334

(2)研究分担者

笹岡 利安 (SASAKA, TOSHIYASU)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
教授
研究者番号 : 00272906

(3)連携研究者

齋藤 滋 (SAITO, SHIGERU)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授
研究者番号 : 30175351

笹原 正清 (SASAHARA, MASAKIYO)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授
研究者番号 : 20154015

鮫島 梓 (SAMESHIMA, AZUSA)
富山大学・附属病院・助教
研究者番号 : 80778465

(4)研究協力者

石川 明香里 (ISHIKAWA, AKARI)
伊藤 哲生 (ITO, TETSUO)
王生 美沙 (IKURUMI, MISA)

田中 智子 (TANAKA, TOMOKO)