

令和元年5月28日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21347

研究課題名(和文) 脂肪細胞における新たな免疫活性化作用の解明

研究課題名(英文) The novel function of adipocyte during activation of NKT cell in the obesity

研究代表者

佐藤 雅 (Sato, Masashi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：40611843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脂質抗原を認識するリンパ球であるNKT細胞に着目し、肥満におけるNKT細胞の機能の解明を目指している。肥満個体の脂肪組織では、脂肪細胞が肥大化し、脂肪組織の炎症が引き起こされ、糖代謝が減弱する。この炎症は、脂肪細胞とNKT細胞との相互作用が重要であることが本研究により示された。しかし、どのような脂質抗原が脂肪細胞によって提示され、NKT細胞を活性化しているかは未だ明らかとなっていないため、その脂質抗原の同定が今後の研究課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満に伴う臓器炎症は免疫細胞によって引き起こされ、その炎症は糖尿病や肥満に深く関わっている。本研究は、肥満炎症の誘導メカニズムとしてNKT細胞が重要であることを示した。本来、感染防御に働くNKT細胞が新たに代謝疾患との関連性もあることが示唆されたことは学術的にも意義があると考えている。また、糖代謝をコントロールする上で、NKT細胞をはじめとする免疫細胞の制御も重要であることが明らかとなり、新たな治療アプローチとして発展していくことを期待する。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the interaction between NKT cell and adipocyte induced adipose tissue inflammation that aggravated glucose metabolism. These evidence were proved by using adipocyte-specific Cd1d deficient mice, that inhibit interaction between NKT cell and adipocyte via CD1d. However, the lipid ligands presented by adipocyte have not been cleared. If the ligands in adipocyte will be identified in the future, NKT cell might be a new therapeutic target against obesity.

研究分野：免疫学

キーワード：NKT cell Adipocyte obesity inflammation insulin resistance

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満や糖尿病などの生活習慣病は、メタボリック症候群の基礎を成し、近年の日本において大きな問題となっている。日本人の 2/3 は生活習慣病が引き金となり死亡しており、中でも、肥満は動脈硬化症をはじめとした様々な疾患の根底にあると言える。そのため、肥満・メタボリック症候群の克服は不可欠であり、またそれは医療費の大幅な削減にも繋がる(生活習慣病医療費は平成 25 年度医療費総額の 12.2%)。肥満は脂肪組織における炎症と考えられ、それは様々な免疫細胞によって制御されていると多くの報告があるが、どのように免疫細胞が活性化され、炎症反応が開始されるのか、その機序は未だ不明な点は多い。

近年、マクロファージをはじめとする様々な免疫細胞が肥満・脂肪組織炎症に関わっているという報告が増えている。M1-マクロファージや CD8⁺ T 細胞は炎症性サイトカイン (TNF- α , IFN- γ , IL-6 など) を産生し、肥満に対して促進的に、一方で M2-マクロファージや制御性 T 細胞は IL-10, IL-4 など産生し、抑制的に働くことがわかっている (McNelis JC et al. *Immunity*, 2014)。申請者はこれらの細胞だけでなく、新たに NKT 細胞も肥満に対して促進的に働くことを明らかにしてきた (Sato M, et al. *PLoS One*, 2012)。肥満の進展においてマクロファージの寄与は大きい、NKT 細胞が欠損すると肥満が抑制されるため、NKT 細胞の働きも重要であり、これは NKT 細胞がマクロファージの上流に位置する可能性を示唆している。

NKT (ナチュラルキラーT) 細胞は、MHC クラス I 分子様の多様性を欠く CD1d 分子によって提示される糖脂質・リン脂質等の脂質抗原を認識し、Th1/Th2 両方のサイトカインを産生するユニークな T 細胞亜群である。NKT 細胞の最大の特徴は、脂質抗原を認識して様々なサイトカインを産生し、免疫システムを調節することである。この特徴に着目し、申請者の研究グループはこれまでに、NKT 細胞が動脈硬化症を促進することを明らかにした (Nakai Y, et al. *Blood*, 2004. Andoh Y, et al. *Immunobiol.*, 2012)。また、CD1d 拘束性 NKT 細胞が欠損 (CD1d^{-/-}マウス) すると高脂肪食給餌による体重増加が抑制され、インスリン感受性が維持されることを見出した (Sato M, et al. *PLoS One*, 2012)。これらの成果から、NKT 細胞は脂質代謝異常の疾患に関連が深く (医学のあゆみ「代謝性疾患と NKT 細胞」, 2015)、NKT 細胞の制御により脂肪組織炎症・メタボリック症候群を含め、生活習慣病を抑制できると考えている。

2. 研究の目的

NKT 細胞の抗原提示分子である CD1d は、抗原提示細胞以外にも発現していることが知られており、最近では脂肪細胞にも発現していることが示された (Schipper HS et al. *J. Clin. Invest.*, 2012, Rakhshandehroo M et al. *J. Biol. Chem.*, 2014)。そこで本研究では、脂肪組織における NKT 細胞の機能を調べることを目的とし、脂肪細胞が NKT 細胞に内因性抗原を提示し、活性化した NKT 細胞が脂肪組織中の免疫応答を調節することで、脂肪組織炎症を誘導されるかを検討する。

3. 研究の方法

脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞と、FACS Aria によりマウス脾臓からソートした NKT 細胞を共培養し、上清中のサイトカインを CBA キットにより測定した。また、リコンビナント IFN- γ 処理をした 3T3-L1 脂肪細胞の RNA を Trizol により抽出し、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

ジャクソン研究所から購入した脂肪細胞特異的に cre リコンビナーゼを発現するマウス (B6: FVB-Tg(Adipoq-cre)1Evdrr/J, stock number 010803) と CD1d を loxP で挟んだマウス (C57BL/6-Cd1d1<tm1.1Aben>/J, stock number 016929) を交配し、脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスを作成した (cKO マウス)。cKO マウスに高脂肪食 (HFD, 日本クレア) を 8 週間給餌し、体重増加や耐糖能を測定した。また、脂肪組織炎症の評価として、脂肪組織に浸潤した細胞群をフローサイトメーターを用いて解析し、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

NKT 細胞と脂肪細胞との共培養による相互作用の検討

脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞とマウス脾臓から単離した NKT 細胞を共培養し、上清中のサイトカイン濃度を測定したところ、CD1d 依存的に IFN- γ や IL-4 などのサイトカインが検出された (図 1)。また、3T3-L1 脂肪細胞に IFN- γ を作用させ、遺伝子発現を調べたところ、*Cd1d1*, *Ccl2*, *Cxcl16* の発現上昇と、*Adipoq* の発現減少が認められた (図 2)。以上から、脂肪細胞は CD1d を介して NKT 細胞に内因性抗原を提示し、NKT 細胞を活性化することができ、NKT 細胞から産生された IFN- γ は脂肪細胞における遺伝子発現を変化させ、脂肪組織炎症を拡大させる可能性が示唆された。

脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスの解析

cKO マウスとコントロールマウスに HFD を給餌したときの体重増加を測定したところ、cKO マウスでは体重増加が抑制され、肝重量と内臓脂肪重量の増加抑制も認められた (図 3・左)。それに加えて、肝臓における脂肪滴の蓄積や脂肪細胞の肥大化も抑制されていた。脂肪組織における *Tnf* や *Ccl2* の発現は、コントロールマウスに比べて cKO マウスでは減少し、一方で、*Adipoq* の発現は cKO マウスのほうが増加していた (図 4)。さらに、血清インスリン濃度も cKO

マウスでは低く、耐糖能試験の結果からもインスリン抵抗性が小さいことがわかった(図3・右)。以上から、HFDの負荷があるときに、脂肪細胞とNKT細胞との相互作用は脂肪組織炎症を惹起し、インスリン抵抗性を誘導することが示唆された。

およびの結果より、脂肪組織においてNKT細胞は脂肪細胞と相互作用し、炎症性サイトカインの産生およびケモカインの発現上昇によって脂肪組織炎症を惹起し、肥満・インスリン抵抗性の誘導に寄与することが明らかとなった(Satoh M, et al. *Sci Rep* 2016)。

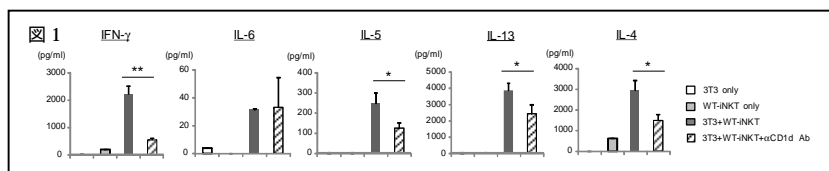


図1. NKT細胞による3T3-L1脂肪細胞との共培養時のサイトカイン産生

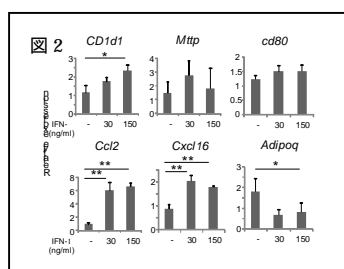


図2. IFN-γによる3T3-L1脂肪細胞の遺伝子発現変化

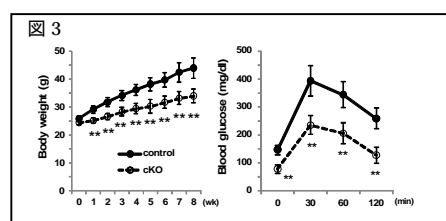


図3. HFD給餌によるコントロールマウスおよび脂肪細胞特異的CD1d欠損マウスの体重変化と耐糖能試験

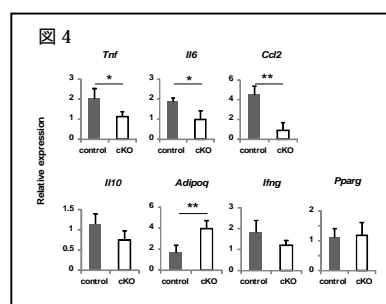


図4. HFD給餌コントロールマウスと脂肪細胞特異的CD1d欠損マウスの脂肪組織における遺伝子発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Nakasone Y, Kumagai K, Matsubara R, Shigematsu H, Kitaura K, Suzuki S, Satoh M, Hamada Y, Suzuki R.: Characterization of T cell receptors in a novel murine model of nickel-induced intraoral metal contact allergy. *PLoS One*. 2018 Dec 17;13(12): e0209248. (査読有)
2. Satoh M and Iwabuchi K. Role of Natural Killer T Cells in the Development of Obesity and Insulin Resistance: Insights From Recent Progress. *Front Immunol* 9:1314, 2018. (査読有)
3. 佐藤 雅, 岩渕和也.: 脂肪組織におけるNKT細胞と脂肪細胞の相互作用. *臨床免疫・アレルギー科* 68: 682-688, 2017. (査読無)
4. Ren Y, Sekine-Kondo E, Shibata R, Kato-Itoh M, Umino A, Yanagida A, Satoh M, Inoue K, Yamaguchi T, Mochida K, Nakae S, Van Kaer L, Iwabuchi K, Nakauchi H, Watarai H.: A Novel Mouse Model of iNKT Cell-deficiency Generated by CRISPR/Cas9 Reveals a Pathogenic Role of iNKT Cells in Metabolic Disease. *Sci Rep* 7: 12765, 2017. (査読有)
5. Takano S, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Aikawa J, Iwase D, Iwabuchi K, Matsumoto T, Satoh M, Mukai M, Minatani A, Takaso M. Nerve growth factor regulation and production by

- macrophages in osteoarthritic synovium. *Clin Exp Immunol* 190: 235-243, 2017. (査読有)
6. 佐藤 雅, 岩渕和也.: NKT 細胞・NK 細胞の脂肪細胞での役割. *医学のあゆみ* 257: 681-685, 2016. (査読無)
 7. Nakamura M, Kagawa L, Nakada N, Satoh M, Maehana S, Kojima F, Amano H, Murakumo Y, Iwabuchi K, Majima M, Kitasato H.: Anti-tumor effects of interferon-beta cell therapy in murine model of melanoma. *Int J Cancer Ther Oncol* 4: 4412, 2016. (査読有)
 8. Satoh M, Namba K-i, Kitaichi N, Endo N, Kitamei H, Iwata D, Ohno, Ishida S, Onoe K, Watarai H, Taniguchi M, Ishibashi T, Stein-Streilein J, Sonoda K-H, Van Kaer L, Iwabuchi K.: Invariant natural killer T cells play dual roles in the development of experimental autoimmune uveoretinitis. *Exp Eye Res* 153: 79-89, 2016. (査読有)
 9. 佐伯美帆, 佐藤 雅, 飯塚みさを, 岩渕和也.: CRISPR/Cas9 を用いた CD1d 欠損胸腺腫細胞株の作製 . *北里医学* 46 : 49-51, 2016. (査読有)
 10. Satoh M, Iwabuchi K.: Communication between natural killer T cells and adipocytes. *Adipocyte* 5: 389-393, 2016. (査読有)
 11. Satoh M, Hoshino M, Fujita K, Iizuka M, Fujii S, Clingan CS, Van Kaer L, Iwabuchi K.: Adipocyte-specific CD1d-deficiency mitigates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Sci Rep* 6:28473, 2016. (査読有)
 12. Okuno H, Satoh M, Takeuchi E, Eshima K, Terashima M, Komotori J, Habu S, Tamauchi H, Iwabuchi K.: Inhibitory function of NKT cells during early induction phase of nickel allergy. *Immunobiology* 221(7):833-8, 2016. (査読有)

[学会発表](計 15 件)

1. Satoh M, Iwabuchi K.: NKT cells control insulin sensitivity by interacting adipocytes and macrophages. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 10th-12th Dec 2018, Fukuoka.
2. Yoshino K, Satoh M, Iwabuchi K.: CD1d-positive antigen-presenting cells in the heart. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 10th-12th Dec 2018, Fukuoka.
3. Imahashi N, Satoh M, Iwabuchi K.: The protective role of MR1/MAIT cell in allergic contact dermatitis. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 10th-12th Dec 2018, Fukuoka.
4. Hane K, Satoh M, Iwabuchi K.: Modulation of NKT-cell function in mice fed on high fat diet (HFD). The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 10th-12th Dec 2018, Fukuoka.
5. Kato T, Satoh M, Iwabuchi K.: Amelioration of relapse model of experimental autoimmune uveoretinitis with NKT cell ligand. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 10th-12th Dec 2018, Fukuoka.
6. 佐藤 雅, 岩渕和也.: NKT 細胞による腸内細菌叢の制御 . 第7回ファージ研究会・2018年日本細菌学会 関東支部インターラボセミナー合同大会、麻布大学
7. Kato T, Satoh M, Iwabuchi K.: Tetramer-based analyses of antigen-specific T cells in relapse model of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 12th-14th Dec 2017, Sendai.
8. Iwayama T, Satoh M, Kobayashi S, Iwabuchi K.: Development of experimental autoimmune myocarditis model and experimental therapeutics with NKT cell ligands. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 12th-14th Dec 2017, Sendai.
9. Kobayashi S, Satoh M, Iwabuchi K.: Cardiac CD1d+ cells that present and α -GalCer and activate

- NKT cells. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 12th-14th Dec 2017, Sendai.
10. Satoh M, Eshima K, Takeuchi E, Iizuka M, Iwabuchi K.: Generation of CD1d-negative NKT-cell hybridomas. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 12th-14th Dec 2017, Sendai.
 11. 佐藤 雅, 岩渕和也.: NKT 細胞による脂肪組織炎症・肥満の誘導. 第 30 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 2017 年 8 月 24 日～25 日, 十和田キャンパス獣医学部本館.
 12. 岩山俊嗣, 佐藤 雅, 北市伸義, 岩渕和也.: 自己免疫性ぶどう膜炎に対する NKT 細胞の抑制効果. 第 28 回日本生体防御学会学術総会, 2017 年 6 月 29 日～7 月 1 日, 神奈川.
 13. 佐藤 雅, 岩渕和也.: 新規 NKT 細胞ハイブリドーマの作製とその脂肪細胞との相互作用. 第 28 回日本生体防御学会学術総会, 2017 年 6 月 29 日～7 月 1 日, 神奈川.
 14. 岩渕和也, 佐藤 雅.: 生活習慣病と NKT 細胞. 第 29 回日本神経免疫学会学術集会 2017 年 10 月 6 日～7 日, 札幌.
 15. Satoh M, Fujita K, Iizuka M, Iwabuchi K.: NKT cell - adipocyte interaction is necessary to induce adipose tissue inflammation. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 5th-7th Dec 2016, Naha.

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
北里大学医学部免疫学ホームページ
<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/immunology/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岩淵 和也

ローマ字氏名：Iwabuchi Kazuya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。