

令和元年9月9日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15614

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームの病態基盤である慢性炎症に対するB細胞機能制御効果の検討

研究課題名(英文)Effects of B cell function on chronic inflammatory response in metabolic syndrome

研究代表者

内仲 彩子(Uchinaka, Ayako's)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・助教

研究者番号：40746921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：拘束ストレス負荷を与えたメタボリックシンドロームモデルDS/obeseラットにおいて、PTEN阻害薬投与は、左室心筋の炎症や線維化、左室拡張障害を抑制した。またPTEN阻害薬は皮下脂肪・内臓脂肪の肥大には影響を与えなかったが、脂肪組織炎症を抑制した。DS/obeseラットにおいて拘束ストレスにより悪化した心筋炎症の改善の少なくとも一部はPTEN阻害薬により血管新生が促進し、低酸素状態が改善したことに起因することが示唆された。また内臓脂肪炎症が抑制された要因として、PTEN阻害薬投与により内臓脂肪組織の制御性B細胞の分布が増加し、炎症抑制方向に免疫細胞分布が変化したことが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、PTEN阻害薬によるPI3K-Aktシグナル制御はメタボリックシンドローム(MetS)の心筋および脂肪組織の病態悪化の抑制に関与していることが示唆された。この作用メカニズムとして、炎症を抑制する制御性B細胞の増加が一因を担っており、MetSにおいて制御性B細胞の増殖を誘導する薬剤の投与の有用性が示された。本研究はMetSモデルラットを用いたことでヒトのMetS病態と免疫機構、特にB細胞との関係を部分的ではあるが明らかとし、B細胞機能を標的とした臨床への応用にも結び付くといえる。

研究成果の概要(英文)：PTEN inhibitor administration to stressed DS/obese rats, which is a model rat of metabolic syndrome, inhibited diastolic left ventricular failure as well as left ventricular inflammation and fibrosis. PTEN inhibitor also suppressed adipose tissue inflammation without affecting adipocyte hypertrophy in visceral and subcutaneous adipose tissue. Attenuation of myocardial inflammation by PTEN inhibitor in stressed DS/obese rats may be attributable, at least in part, to improvement of hypoxic condition by stimulation of angiogenesis. Furthermore, the increases of regulatory B cell distribution by PTEN inhibitor contributed to the inhibition of visceral adipose tissue inflammation.

研究分野：代謝疾患

キーワード：メタボリックシンドローム B細胞 PTEN

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MetS) では、脂肪組織に慢性炎症がおき、全身に悪影響を与えると考えられているが、そのメカニズムはまだよくわかっていない。慢性炎症は一つの臓器にとどまらず、遠隔臓器における慢性炎症を誘導し臓器連関による慢性炎症の拡大は、生活習慣病において複数臓器の機能異常を合併する基盤として重要と考えられる。肥満時には、体重増加に伴い、脂肪細胞も肥大化し、マクロファージやリンパ球などの多数の免疫細胞浸潤とともに組織が再構築される結果、脂肪組織の機能障害に至る。このような免疫担当細胞の量的及び質的異常から脂肪組織の炎症が生じ、糖代謝異常などを引き起こし MetS へ進展していく。申請者らは、Dahl 食塩感受性ラットに Zucker 肥満ラット由来の肥満遺伝子 (*Lepr^{fa}*) を導入した新しいコンジェニックラット Dahl S.Z-*Lepr^{fa}/Lepr^{fa}* (DS/obese) を作製し、その基本病態、臓器合併症を明らかにし、MetS の新しい動物モデルとして確立した (Nutr Diabetes. 2011; Hypertens Res. 2012)。このモデルラットはヒトの MetS と同様の病態を有しており、インスリン抵抗性を基盤として、ストレスや炎症に伴い、肝・腎障害、心肥大・左室拡張障害や高血圧を呈する。交感神経系は免疫系と直接的なインターフェイスを形成しており、慢性的なストレスを生体を与えると、活性化した交感神経系により免疫応答が制御されることが知られている。また、ストレスによる視床下部-脳下垂体-副腎系の活性化にともない副腎皮質から分泌されるコルチゾールにより免疫抑制作用が生じる。DS/obese ラットに対して慢性的に寒冷ストレスや拘束ストレスを与えると、内臓脂肪炎症だけでなく糖代謝の悪化を示した。またこの病態の悪化はグルココルチコイド受容体遮断薬や、遮断薬により改善された。申請者らはこれまで、心筋組織および脂肪組織における炎症をマクロファージ浸潤や炎症性サイトカイン遺伝子の発現を指標とし解析を行ってきた。また、最近では MetS の病態における免疫機構にも着目し、フローサイトメトリーを用いた脂肪組織や脾臓における T 細胞サブセットの解析を行い、Dahl S.Z-*Lepr^{fa}/Lepr^{fa}* (DS/lean ラットに比し、DS/obese ラットの脾臓および内臓脂肪組織 (精巣上体脂肪) において制御性 T 細胞 (CD25⁺CD4⁺Foxp3⁺T 細胞) の減少を認めた。MetS 病態における炎症反応をターゲットにした免疫学的な観点からの解析、さらにサイトカインや炎症マーカーの産生・発現量についての分子生物学的解析を行うことで、未知の免疫機構の解明や生活習慣病のメカニズムの解明、そして新たな治療法の開発へとつながることが期待される。近年の多くの研究により、脂肪組織炎症におけるマクロファージや T 細胞の関与が明らかとなってきた。健常時の脂肪組織においては M2 マクロファージ、Th2 細胞、制御性 T (Treg) 細胞、好酸球が比較的多く分布しており、これらは炎症の抑制に働いている。M2 マクロファージや Treg 細胞が分泌する IL-10 などの抗炎症性サイトカインによって炎症性細胞の活性化が抑制され、免疫応答が適切に調整されている。しかしながら、肥満になると、脂肪組織に分布する免疫担当細胞の組成が大きく変化し、CD8⁺T 細胞や炎症促進に働く M1 マクロファージの数が増加する。このような、炎症抑制形質を有する細胞群と炎症促進形質を有する細胞群とのバランスの変化や密接な相互作用が脂肪組織における炎症の顕在化をもたらし、MetS 病態が形成される。マクロファージや T 細胞の肥満時における機能については多くの報告がある一方で、肥満によって誘導される脂肪組織炎症における B 細胞の関与については不明な点が多い。B 細胞は抗体を産生し液性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球であり、T 細胞同様自己免疫疾患、炎症、アレルギーにおいては発症や病態の悪化に関与することが広く知られている。末梢 B 細胞は、B-1 B 細胞と B-2 B 細胞のサブセットに分類される。活性化された B-1 B 細胞は IgM 分泌により、マクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制し、脂肪組織炎症を負に制御する。一方、B2-B 細胞は病原性抗体の産生を介してインスリン抵抗性や耐糖能異常を促進する。肥満状態における B-2 B 細胞は抗炎症性サイトカイン IL-10 産生能が低下しており、代わりに炎症促進性サイトカインを多量に分泌する。つまり B2-B 細胞はメタボリックシンドロームを含む慢性炎症を基盤とした代謝異常を促進させる。これらの B 細胞サブセットとは別に Treg 細胞と同様に免疫応答を負に制御する制御性 B 細胞の存在が示され、近年 B 細胞のもつ新たな機能として注目されている。この制御性 B 細胞は IL-10 を恒常的に産生するのが特徴であり、B-1 B 細胞や B-2 B 細胞とは異なる表面マーカーを有した特異なサブセットを形成している。最近の報告から脂肪組織にも IL-10 を産生する多数の B 細胞が存在することが明らかとなった。また、肥満マウスやヒトの肥満患者では脂肪組織の制御性 B 細胞が減少しており、さらに制御性 B 細胞を活性化するとインスリン抵抗性が改善したという報告もある。また、マウス脾臓に存在する IL-10 産生型制御性 B 細胞は B 細胞に特異的に発現しておりその活性化シグナルを増強する分子である CD19 陽性かつ CD1d^{hi}CD5⁺ の表現型を有していることも明らかとなり、制御性 B 細胞特定マーカーとして有用であることが示されている。

IL-10 産生 B 細胞は CD8⁺T 細胞を抑制する一方、制御性 T 細胞活性を高めることでも炎症反応を抑制するといわれており、IL-10 産生制御性 B 細胞の制御機構においては、PI3K/Akt 経路が重要であるという報告もされている。制御性 B 細胞を効率的に分化・増殖させる方法として、PI3 シグナル活性を上げる PTEN 阻害剤の有用性も考えられ、PTEN 阻害剤による制御性 B 細胞の増殖法を確立させ、慢性炎症を基盤とするメタボリックモデルに臨床応用できれば、新規治療法の開発に発展する可能性も考えられる。また、制御性 B 細胞は複数のサブセットが存在することも示唆されている。炎症や感染などによる刺激や局在により複数の分化過程や活性化を経た制御性 B 細胞が存在する可能性も考えられる。制御性 B 細胞に多種多様な形質があるというこ

とは、疾患ごとにその性状や機能、分子機構を明らかにすることが病態の解明においても必須になる。

2. 研究の目的

メタボリックシンドローム (MetS) の動物モデルを用いて、免疫学的手法による B 細胞サブセットを中心とした免疫担当細胞の分類を行うと同時に、慢性ストレスおよび B 細胞増殖刺激への薬理的介入下での影響について多面的な解析を加えることで、MetS 病態と B 細胞を中心とした免疫応答の関連、詳細な分子病態を解明し、新たな治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

免疫学的解析を中心とした多面的な解析を行うことにより、MetS 病態と B 細胞を中心とした免疫応答の関係を解明し、新たな治療法の開発を目指し、次の検討を行う。

【初年度】平成 29 年度では MetS 病態における B 細胞を中心とした免疫担当細胞の解析を実施する。DS/obese ラットを用いて、免疫系応答の制御に関与している慢性ストレス及び B 細胞増殖刺激への薬理的介入を与えた際の脂肪組織炎症および脾臓における B 細胞サブセットの分布および動態、その他免疫担当細胞への影響についてフローサイトメトリーを中心とした免疫学的手法を用いてにより詳細に解析する。

<動物実験プロトコール>

雄性 DS/obese ラットを 8 週齢で入手し、通常飼料を与える。ヘテロ個体同士の交配により生まれる DS/lean ラットを対照動物として用いる。9 週齢に次の 6 群に群分けし検討する。

- 1) DS/lean + vehicle n=10
- 2) DS/lean + PTEN 阻害剤 n=12
- 3) DS/obese + vehicle n=10
- 4) DS/obese + 拘束ストレス+ vehicle n=12
- 5) DS/obese + 拘束ストレス + PTEN 阻害剤 n=12

4)、5) 群には 9 週齢より 1 日 2 時間の拘束ゲージで飼育し、ストレス負荷を与える。2)、5) 群には 9 週齢より B 細胞増殖を促す目的で PTEN 阻害剤 bisperoxovanadium を 0.2 mg/kg/day の用量で腹腔投与を行う。投与 2 週間後に、内臓脂肪組織および脾臓を摘出し、フローサイトメトリーを用いて以下に示す免疫学的な解析を実施する。

・ B リンパ球サブセット解析

抗 CD19 抗体、抗 CD45R 抗体を用いて分離した mature B 細胞に、蛍光標識した抗 B220 抗体を反応させ、B-1 B 細胞 (CD19⁺B220⁻) と B-2 B 細胞 (CD19⁺B220⁺) の比率を測定する。さらに B-1B 細胞については、抗 CD5 抗体と反応させ、B-1a 細胞 (CD19⁺CD5⁺) と B-1b 細胞 (CD19⁺CD5⁻) に分類し解析する。加えて、分離した mature B 細胞に抗 CD1d 抗体、抗 IL-10 抗体を反応させ、制御性 B 細胞 (CD19⁺CD1d^{hi}IL-10⁺) の割合を測定する。

【次年度以降】拘束ストレス及び B 細胞増殖刺激を加えた際の MetS の基本病態への作用や効果について投与 4 週間後まで病態を観察し、フローサイトメトリーや ELISA 法による免疫学的解析に加え、生理学的解析、組織学的解析、生化学的解析、遺伝子発現解析により多面的に検討する。

<動物実験プロトコール>

平成 29 年度に行った動物実験と同様に 9 週齢期に雄性 DS/obese ラットおよび DS/lean ラットを上記の 5 群に群分けを行い、拘束ストレス負荷または薬剤投与を 4 週間実施する。9 週齢以降、毎週 1 回、体重、血圧・心拍数測定 (tail-cuff 法)、摂食量・飲水量の測定を行い、13 週齢において下記の検討を行い、MetS 病態への効果を多面的に解析する。

・糖代謝：糖負荷試験、インスリン負荷試験

・尿タンパク定量：代謝ケージを用いた 24 時間蓄尿を行い、尿量、尿中電解質および尿タンパクの定量、24hr クレアチニンクリアランスを測定する。

・生理学的解析：心エコー装置を用いて、M モード法により左室拡張末期・収縮末期径 (LVIdd・LVIS) および心室中隔・後壁厚 (IVST・LVPWT) を計測し、左室内径短縮率 LVFS (%), 駆出率 LVEF (%) を算出する。またドブラ法を用いて左室拡張機能指標 (E/A, Dct, IRT, E/e') を計測する。心カテテルも実施し、左室拡張末期圧 (LVEDP)、左室弛緩時定数 (Tau)、左室拡張期ステイフネス (LVEDP/LVId) 等の観血的な心機能指標を算出する。

・生化学的検討：全採血により得た血清を用いて、血糖、血清コレステロール (総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール)、トリグリセリド (TG)、遊離脂肪酸 (FFA) を測定する。また ELISA 法により血中インスリン濃度を測定し、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR およびインスリン基礎分泌能の指標である HOMA-β を算出する。

・臓器重量：心臓、肺、皮下 (鼠径部) および内臓 (後腹膜、精巣上体、腸間膜) の脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓、腎臓、膵臓、脛骨を摘出し、重量を測定。

内臓脂肪組織および脾臓の免疫学的解析：平成 29 年度と同様の項目を検討

・組織学的解析：ヘマトキシリン・エオジン染色による心筋細胞肥大の評価、アザン・マロリー染色による心筋線維化の評価。炎症細胞の集積：抗 CD68 抗体を用いた免疫組織化学染色による左室心筋組織や脂肪組織へのマクロファージの浸潤の評価。

- ・酸化ストレスの解析：心筋組織を用いてジヒドロエチジウムを用いた活性酸素の染色、NADPH オキシダーゼ活性の測定。定量 PCR 法による心筋の NADPH オキシダーゼサブユニットの mRNA 発現の定量、比色法を用いた脂肪組織の TBARS の定量。
- ・遺伝子 mRNA 発現解析：定量 real-time PCR 法により肥大関連遺伝子、線維化関連遺伝子、炎症関連遺伝子、糖・脂質代謝関連遺伝子等の mRNA 発現を定量。
- ・タンパク発現解析：ウエスタンブロット法によりインスリンシグナル関連因子を含むタンパク発現を定量。

4 . 研究成果

メタボリックシンドローム (MetS)の動物モデル Dah1S.Z-Leprfa/Leprfa (DS/obese)ラットとその対照動物である Dah1S.Z-Lepr+/Lepr+ (DS/lean)ラットを 8 週齢 で入手し、9 週齢に PTEN 阻害薬 (bisperoxovanadium-pic, 0.2 mg/kg, i. p.)投与群と非投与群に分け、さらに DS/obese ラットについては拘束ストレス(2 時間 /日、午前) 負荷群と非負荷群 に群分けした。11 週齢に心形態・機能評価を行った後、臓器摘出を行い、MetS 病態への効果を多面的に解析した。拘束ストレス負荷を与えた DS/obese ラットにおいて PTEN 阻害薬は摂食量や体重、左室肥大には影響を及ぼさなかったが、高血圧、左室拡張障害、心筋線維化、心筋炎症を改善した。また、拘束ストレスにより CD31 免疫染色で示される心筋毛細血管密度の減少と VEGF の心筋発現の低下が認められた。さらに、拘束ストレスは 脂肪量と脂肪細胞のサイズには影響を及ぼさなかったが、脂肪炎症を増悪させるとともに、Breg 細胞比率の減少および CD8 + T 細胞比率の増加を惹起した。拘束ス トレス負荷によるこれらの効果はすべて PTEN 阻害薬により抑制された。以上の結果より、拘束ストレス負荷を与えた DS/obese ラットにおいて、PTEN 阻害薬投与は、左室心筋の炎症や線維化、左室拡張障害を抑制した。また PTEN 阻害薬 は皮下脂肪・内臓脂肪組織炎症を抑制した。DS/obese ラットにおいて拘束ストレスにより悪化した心筋炎症の改善の少なくとも一部は PTEN 阻害薬により血管新生 が促進し、低酸素状態が改善したことに起因することが示唆された。また内臓脂肪炎症が抑制された要因として、炎症抑制方向へと拘束ストレスによる内臓脂肪 組織の炎症制御細胞の分布が変化したことが考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 83 回日本循環器学会学術集会

2019 年 3 月 29 日 31 日

PTEN Inhibition Improves Cardiac Pathology and Attenuates Adipose Inflammation by Increasing Regulatory B Cells in Stressed Rats with Metabolic Syndrome

芦川采央、内仲彩子、中野志保、小松優希、青山清志、室原豊明、永田浩三

第 41 回日本高血圧学会総会

2018 年 9 月 14 日 16 日

PTEN 阻害薬は脾臓の免疫応答の抑制を介してメタボリックシンドロームラットの皮下脂肪炎症を抑制する

PTEN Inhibitor Suppressed the Inflammation of Subcutaneous Adipose Tissue through Inhibiting Splenic Immune Response in Rats with Metabolic Syndrome.

内仲彩子、河合夢乃、小室佳奈子、藤枝愛生、綿谷美南、米田護、小松優希、青山清志、室原豊明、永田浩三

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

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：
ローマ字氏名：

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。