

令和元年6月26日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16838

研究課題名(和文) エストロゲンの制御性T細胞を介した妊娠維持機構と糖代謝調節は存在するのか

研究課題名(英文) What is the role of regulatory T cell via estrogen receptor in pregnancy maintenance and glucose metabolism.

研究代表者

鮫島 梓 (Sameshima, Azusa)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：80778465

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)：エストロゲン(E2)は性周期や妊娠に関わるだけでなく、糖脂質代謝、骨代謝、免疫など多岐にわたる。モデルマウスを用いてエストロゲン受容体を介した制御性T細胞の役割について検討した、エストロゲンは妊娠時の脂肪組織の炎症に寄与し、糖代謝の維持に関与している可能性が示された。マウスを卵巣摘出すると、4週間後から糖代謝異常が認められるようになる。脂肪組織では1週間の時点で変動する遺伝子があることがわかった。この遺伝子は、閉経後の糖尿病発症のに関与していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はエストロゲンの免疫、特に制御性T細胞を介した代謝制御の研究であり、独創性が高い。妊娠期の母児免疫寛容に重要であるTregの増加の機序にエストロゲン受容体は必須ではないことが初めて明らかになった。女性は閉経後、早期に肥満、糖尿病を発症するのではなく、5-10年のタイムラグがあり、この期間は未病状態にあると考えられる。この時期に介入することで閉経後の肥満、糖脂質代謝異常を予防できる可能性がある。本研究による未病状態の脂肪組織の変化は予防医学的観点からも意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Estrogen is one of the most important hormones, regulating sexual function and reproduction. Estrogen is also known to be multi-functional, with roles in the regulation of glucose metabolism, the maintenance of bone turnover, and immunological mechanism especially in women. We aimed to clarify the impact of estrogen receptor alpha deletion in T cells on the glucose metabolism, T cell distribution, and chronic inflammation in obese and gestational diabetes mellitus mice model. Estrogen receptor alpha of T cells contributes to the maintenance of glucose metabolism in gestational diabetes mellitus condition with high E2 environment, possibly by controlling localization of regulatory T cells and helper T cells.

Female ovariectomized mice showed glucose intolerance after 4 weeks on the high fat diet. Expression levels of some genes were fluctuated in perigonadal adipose tissue after 1 week. These genes may prevent the development of diabetes in postmenopausal women.

研究分野：エストロゲンと糖代謝

キーワード：エストロゲン 更年期 糖尿病 妊娠糖尿病 不育症 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エストロゲン(E2)は性周期や妊娠に関わるだけでなく、糖脂質代謝、骨代謝、免疫など多岐にわたる。エストロゲンの免疫への影響の一つとして制御性 T 細胞 (Treg) への分化増殖を促進し、妊娠中の母体での免疫寛容を誘導している。ヒト (Sasaki, Shima ら, *Mol Hum Reprod.* 10: 347-353, 2004) 、マウス (Aluvihare ら, *Nat Immunol.* 5: 266-271, 2004; Zenclussen ら, *Am J Pathol.* 166: 811-822, 2005, Robertson ら, *Biol Reprod.* 80: 1036-1045, 2009) とともに妊娠時には Treg 細胞が増加している。不育症は繰り返す流産によって生児を得られない状態であり、リスク因子としては抗リン脂質抗体症候群、染色体異常、子宮形態異常、甲状腺機能異常、プロテイン S 欠乏症などがあるが、約半数はいまだリスク因子不明である。免疫異常は原因不明不育症患者の約 3 割を占めるとされ、Treg 細胞の関与が示唆されている。流産モデルマウス (Zhu ら, 2005) ならびにヒト反復流産症例 (Sasaki ら, *Mol Hum Reprod.* 10: 347-353, 2004) では Treg 細胞数が正常妊娠例に比較して有意に減少していた。リスク因子不明不育症例の胎児染色体正常流産例では、着床部に限って Treg 細胞が減少していること (Inada, Shima ら, *J Reprod Immunol.* 2013) も報告されており、ヒトでも Treg 細胞の減少が原因不明流産の原因になっている可能性がある。また、原因不明不妊の子宮内膜では Treg 細胞の転写調節因子である Foxp3 の mRNA 発現レベルが減少しているという報告 (Jasper ら, *Mol Hum Reprod.* 12: 301-308, 2006) もある。また、アロ交配および同系交配マウスの着床前、妊娠初期 (妊娠 4.5 日および 7.5 日) に抗 CD25 モノクローナル抗体を投与し Treg 細胞を除去すると、着床不全および流産が誘導されることが示されている (Shima ら, *J Reprod Immunol.* 85: 121-9, 2010) 。CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞をエストロゲンと共に細胞分化を誘導すると、制御性 T 細胞への分化が増加するため (Magdalena ら, *J Immunol.* 173: 2227-2230, 2004)、妊娠中の Treg 増加は E2 濃度の上昇に伴うものと考えられているが、その機序を未だ不明であり、本研究ではこの点を明らかにすることを目的とした。

さらに Treg はマクロファージの機能にも影響する。一方、肥満や糖尿病患者における脂肪組織のマクロファージによる慢性炎症とインスリン抵抗性の関連が報告されている (Osborn ら, *Nature Med.* 18: 363-374, 2012) 。ヒトでは肥満者と比較して健常者には Treg が多く存在し、肥満モデルマウスの ob/ob マウスは内臓脂肪組織においてマクロファージ、T 細胞の割合が増加している一方、制御性 T 細胞の割合が減少していることも報告されており (Osborn ら, *Nature Med.* 18: 363-374, 2012) 、Treg は糖代謝にも影響していることが示唆されている (Feuerer ら, *Nature Med.* 15: 930-939, 2009) 。女性では 40 代までは肥満、糖尿病の割合が男性に比して低いが、閉経後、エストロゲンの低下に伴い肥満や糖尿病のリスクが増加する。閉経後の血中 E2 欠乏は内臓脂肪蓄積や耐糖能低下を引き起こし、E2 の末梢投与はこれらを改善することが知られている。E2 は脂肪、ヒト、マウスともに内臓脂肪組織の慢性炎症がインスリン抵抗性と関連していることはすでに報告されている。閉経肥満モデルマウスにおいても M1 マクロファージの増加、炎症性サイトカイン (TNF など) の上昇が認められ、閉経後にはエストロゲン低下に伴い、内臓脂肪組織において慢性炎症が惹起され、インスリン抵抗性が増悪する可能性が示唆されている (Yonezawa ら, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303: 445-456, 2012) 。申請者は妊娠糖尿病、閉経後の糖代謝異常、エストロゲンや新規糖尿病薬の DPP-4 阻害薬の作用につき、研究を継続してきた中で (J Endocrinol, 2015) エストロゲンによる Treg 調節を介した糖代謝と妊娠維持機構が存在すると考えた。研究の背景として、エストロゲンが Treg を増加することは、これまで報告されている。また、これまでの申請者のデータで閉経肥満マウスでは負荷 1 2 週後に糖代謝異常の増悪を認める。負荷 8 週後では内臓脂肪中の炎症を惹起させる M1 マクロファージが増加していたが、Treg も増加しており、TNF、MCP1 などの糖代謝を阻害するサイトカイン産生は低く、糖代謝異常も認めなかったが、負荷 1 6 週後に Treg が著明に減少すると、糖代謝異常の増悪が認められた。このことより、エストロゲンが Treg を増加させているが、それが消失することにより炎症が起こりやすくなり、糖代謝が障害されるのではないかと仮説を立てた。このことを動物モデルから証明することを本研究の目的とした。

2. 研究の目的

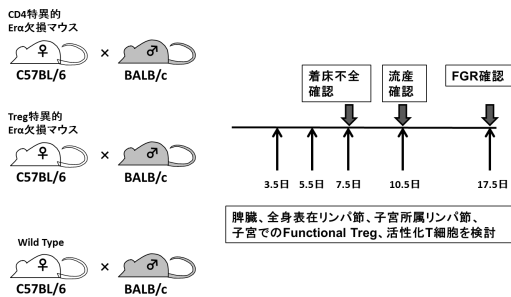
エストロゲン (E2) は性周期や妊娠に関わるだけでなく、糖脂質代謝、骨代謝、免疫など多岐にわたる。E2 の免疫への影響として制御性 T 細胞 (Treg) への分化増殖を促進し、妊娠中の母体での免疫寛容を誘導している。さらに Treg を介してマクロファージ (M) の機能にも影響する。一方、肥満や糖尿病患者における脂肪組織の M による慢性炎症とインスリン抵抗性の関連が報告されている。申請者は妊娠糖尿病、閉経後の糖代謝異常、E2 の中枢作用につき、研究を継続してきた中で、E2 による Treg 調節を介した妊娠維持機構と糖代謝が存在すると考えた。そこで、本研究では新たに遺伝子改変マウスを作製し、これを用いて E2 の免疫を介した糖代謝調節と閉経期の病態生理の解明、妊娠維持機構の解明を目的に本研究を立案した。

3. 研究の方法

本研究では新たに遺伝子改変マウスを作製し、これを用いてエストロゲンの免疫を介した妊娠維持機構と糖代謝調節と閉経期の病態生理の解明を目的に本研究を立案した。

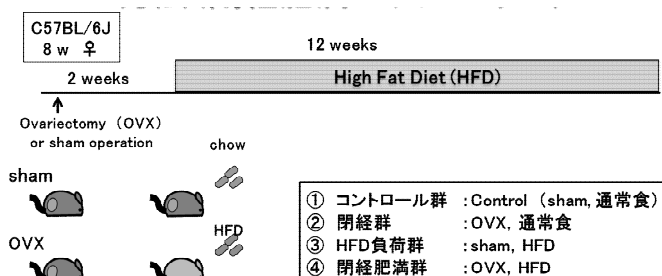
(1)CD4+T 細胞および Treg 特異的 ER 欠損マウスの作製：エストロゲンの T 細胞に与える影響を直接見るため、妊娠期の高エストロゲン状態でも内在性エストロゲンの影響を受けないマウスが必要と考え、Cre-loxp システムを用いて CD4+T 細胞および Treg 特異的 ER 欠損マウスを作製した。CD4+T 細胞に発現する CD4、制御性 T 細胞に特異的に発現が認められる foxp3 のプロモーター制御下で Cre コンビナーゼを発現する Cre マウス (それぞれ CD4-Cre マウス、foxp3-Cre マウス) を作成した。これらのマウスと ER の遺伝子領域を loxp で挟んだ ER^{-flox} マウスと交配させることで CD4+T 細胞および Treg における組み換えを起こし、CD4+T 細胞および Treg 特異的 ER 欠損マウスを作製することに成功した。

(2)CD4+T 細胞特異的 ER 欠損マウスの妊娠における免疫寛容の解析:CD4+T 細胞特異的 ER 欠損マウスに同系統交配 (C57BL/6 マウス) およびアロ交配 (BALB/c) をさせ、膣栓にて妊娠成立を確認した。妊娠成立したマウスを妊娠 3.5 日目、5.5 日目、7.5 日目、10.5 日目、17.5 日目に解剖し、脾臓、全身表在リンパ節、子宮所属リンパ節および子宮からリンパ球を分離したうえで、フローサイトメトリーにて functional Treg 細胞 (CD4+CD25+ CD45RO+Foxp3+) の変動を解析した。同時に着床率、流産率や胎仔体重を検討した。



(3) T 細胞特異的 ER 欠損マウスの妊娠における糖代謝の解析：T 細胞特異的 ER 欠損マウスに高脂肪食負荷し、エストロゲンが ER を介して、Treg の分化増殖、及び活性化に作用することがマウスの糖代謝と脂肪組織の慢性炎症に影響するかを解明した。また、これらのマウスをアロ交配させたときの糖代謝の変化を解析し、妊娠時の Treg の変化が妊娠糖尿病 (GDM) の発症に関与するかを検証した。雌性の CD4-cre, ER^{fl/fl} (KO) および対照マウスの ER^{fl/fl} (FL) マウス (C57BL/6 背景) に 60%高脂肪食 (HFD) を 4 週間給餌後、雄性 BALB/c とアロ交配させた。交配翌朝にプラグチェックにより妊娠非妊娠の判定を行い、妊娠マウスを FL-GDM, KO-GDM、また非妊娠マウスを FL, KO と定義した。HFD 給餌を継続し、胎生 13.5 日に糖負荷試験、胎生 16.5 日にインスリン負荷試験を行った。胎生 18.5 日に解剖し、脾臓、胸腺、および内臓脂肪の Treg 数をフリーサイトメトリーにて、内臓脂肪の炎症性サイトカイン発現を real time PCR にて解析した。

(4) 閉経モデルマウスの解析：8 週齢の雌 C57BL/6 マウスに卵巣摘出術 (OVX) を行い、術後 1 週より 12 週間高脂肪食負荷 (HFD) を行い、閉経肥満モデルマウス (OVX-HF) とした。またコントロール群 (Sham) は sham 手術を行い、通常食を与えた。閉経モデルとして卵巣摘出群 (OVX)、さらに偽手術高脂肪食負荷群 (sham-HF) を作製し、4 群の代謝表現型、体脂肪組成などを比較検討した。各マウスの体重、血圧、体温を測定し、体脂肪分布は MRI にて、エネルギー消費量は小動物代謝計測システムを用いて測定した。また耐糖能とインスリン感受性は、糖負荷試験およびインスリン負荷試験により評価した。血清は生化学的に解析し、性腺周囲脂肪および肝臓は組織学的または免疫組織化学的に検討した。また、フローサイトメトリーによる脾臓および内臓脂肪の CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、Treg (CD4+CD25+Foxp3+) および M1 および M2 マクロファージの数を測定した。白色脂肪組織、褐色脂肪組織、および肝臓の遺伝子発現 (TNF、MCP1、PPAR、LPL、FAS、HSL、UCP1,7PGC1、PEPCK、G6pase など) は real-time PCR にて検討した。これにより閉経による脂肪組織での T 細胞およびマクロファージと炎症所見、および糖代謝との関連を解明した。同時に CD4+T 細胞、Treg 特異的 ER 欠損マウスに卵巣摘出を行わず、高脂肪食負荷した際の体重増加、体脂肪分布、血圧、耐糖能、インスリン感受性、代謝ケージを用いてエネルギー消費量を測定した。



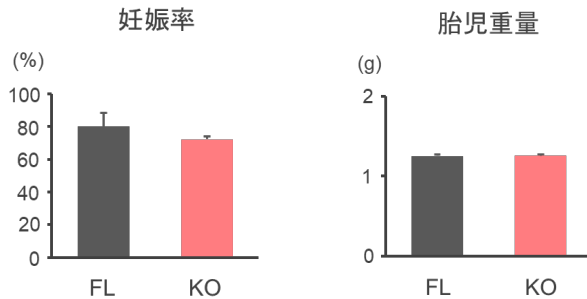
4. 研究成果

(1) CD4+T 細胞特異的 ER 欠損マウスの作製

動物モデルとして CD4+T 細胞のみにエストロゲン受容体 (ER) を欠損するマウスを作製し、安定した繁殖が得られた。

(2) CD4+T 細胞特異的 ER 欠損マウスの妊娠における免疫寛容の解析

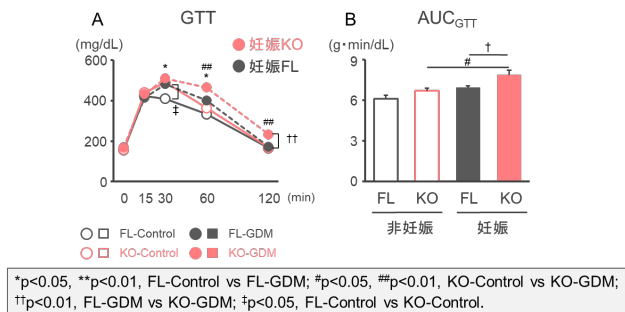
流産率、および出生仔体重は FL マウスと KO マウスで差異を認めなかった。妊娠により胸腺 Treg は FL, KO 両群で増加したが、子宮 Treg は FL でのみ増加した。制御性 T 細胞を含む T 細胞のエストロゲン受容体 はアロ妊娠継続に必須でないことが示唆された。



(3) T 細胞特異的 ER 欠損マウスの妊娠における糖代謝の解析

FL-GDM マウスは FL マウスに比べ耐糖能の悪化とインスリン抵抗性を示し、GDM 病態を呈していた。また GTT で、KO-GDM は FL-GDM に対してさらなる耐糖能の悪化を認めた ($p < 0.05$)。

T細胞特異的ER α 欠損がGDMマウスの耐糖能に与える影響



インスリン感受性は非妊娠マウスに対し両妊娠マウスで悪化したが、KO と FL 間では差異を認めなかった。妊娠により胸腺 Treg は FL, KO 両群で増加したが、子宮 Treg は FL でのみ増加した。また内臓脂肪と脾臓の Treg は各群で有意な変化を示さなかった。一方、KO-GDM の内臓脂肪では FL-GDM に比べ 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) の転写因子 T-bet と Th1 が産生する IFN γ 、および Th17 の転写因子 ROR γ t の mRNA 発現の増加傾向を認めた。さらに、KO-GDM の内臓脂肪ではマクロファージマーカー F4/80、炎症性マクロファージマーカーの CD11c、ならびに TNF の発現が有意に増加した。

T細胞特異的ER α 欠損がGDMマウスの内臓脂肪組織における炎症関連遺伝子発現に与える影響

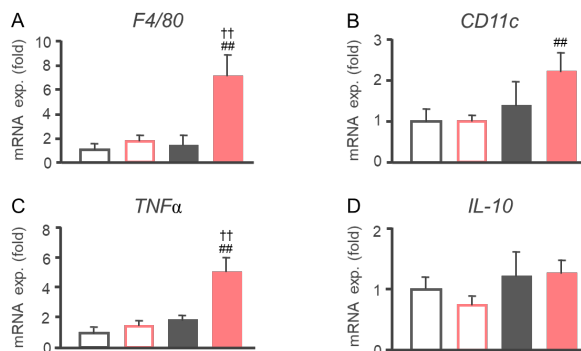


Fig 6. mRNA expressions of inflammation-related genes in gWAT. ## $p < 0.01$, KO-Control vs KO-GDM; †† $p < 0.01$, FL-GDM vs KO-GDM.

Legend: FL-Control (white), FL-GDM (black), KO-Control (red), KO-GDM (dark red)

T細胞特異的 ER 欠損マウスは GDM 病態下でヒトと類似した T細胞サブセットの異常を示した。T細胞に対する ER 作用は内臓脂肪の Treg 数には影響しないが、Th1/17 の局在化による慢性炎症を抑制し、耐糖能の維持に寄与すると考えられた。

(4)閉経モデルマウスの解析：

閉経により脂肪組織で M1 マクロファージが増加し、炎症所見の増悪 が認められ、糖代謝との関連性が示された。さらに制御性 T細胞の関連を明らかにするため、閉経肥満モデルマウスに制御性 T細胞を輸注した。輸注した制御性 T細胞の 80%が内臓脂肪に動員されていることが確認できたものの、耐糖能に有意な変化は得られなかった。CD4+T細胞特異的 ER 欠損マウスの卵巣摘出を行い、閉経状態としたマウスで糖代謝、内臓脂肪組織の炎症を検討したが、有意な差は得られなかった。

閉経後、糖尿病になる前の未病状態でカギとなる遺伝子を検出するために、閉経モデルマウス(卵巣摘出)閉経肥満モデルマウス(卵巣摘出、高脂肪食負荷)コントロールマウス(偽手術)を飼育し、耐糖能異常が出現する負荷開始後2か月までの内臓脂肪組織の変化を DNA チップを用いて解析した。さらに DNB (Dynamic Network Biomarkers)理論を用いて、閉経肥満モデルマウスの未病状態の変動マーカーを検出した。1週間後の内臓脂肪組織において、変動の大きかった遺伝子の一つとして CD52 が検出された。次に CD52 ノックアウトマウスに卵巣摘出を行い、ワイルドタイプマウスと比較し、耐糖能や体重などの代謝表現型 に差があるかを検討した。卵巣摘出のみでは CD52 ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスの間に有意な差はなかった。今後、高脂肪食負荷など条件を変更して検討を継続する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

田中智子、和田努、宇埜生美恵、荻原沙季、石川明香里、伊藤哲生、王生美沙、鮫島梓、恒枝宏史、齋藤滋、笹岡利安 CD4+T細胞特異的 ER 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 ; 2018

田中智子、和田努、宇埜生美恵、荻原沙季、叶喬博、石川明香里、伊藤哲生、王生美沙、鮫島梓、恒枝宏史、笹岡利安、齋藤滋 T細胞に対する ERαを介したエストロゲン作用が肥満および妊娠糖尿病マウスの糖代謝に及ぼす影響 . 第 33 回日本生殖免疫学会学術集会 ; 2018

〔図書〕(計0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

(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。