

令和 4 年 8 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08997

研究課題名(和文) 肥満未病の鍵因子CD52による代謝疾患の予防と治療学的意義の解明

研究課題名(英文) Preventive and therapeutic significance of CD52 in metabolic diseases with obesity

研究代表者

笹岡 利安 (SASAKA, TOSHIYASU)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：00272906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病を発症前の未病状態で捕捉することは予防・治療戦略に重要である。網羅的遺伝子変動の数理解析により見いだされたT細胞免疫を制御する未病候補因子CD52の肥満病態における意義を検証した。CD52の発現は高脂肪食摂取による肥満マウスでの内臓脂肪で特異的に発現が増加した。高脂肪食を負荷したCD52欠損マウスの肝臓において、慢性炎症の指標であるTNFとIL1の発現は増加した。一方で、IFNの発現は内臓脂肪組織で増加傾向を示した。また、CD52欠損により耐糖能の増悪が認められた。CD52は脂肪-肝組織連関による慢性炎症の制御を介して未病因子として働き、肥満病態の進展抑制に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病気の発症前状態である「未病」への対策は究極の予防医学であり、今後の医療に対する国家戦略と位置付けられている。本研究により、「未病肥満」の鍵因子CD52が、実際に2型糖尿病などの代謝疾患を未病状態で抑制する生体防御因子であることが明らかとなり、本因子を標的とした未病状態からの介入の実現化に向けた研究が加速すると考えられる。また、本成果をプロトタイプとして、神経変性疾患やがんなど他の多彩な疾患の未病状態への介入法の開発研究に応用され、学際的波及効果は極めて高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is important to capture the condition before the onset of obesity as a cause of diabetes. By comprehensive mathematical analysis of gene fluctuation, CD52 is found as a "Mibyoun" candidate factor involved in obesity. We examined the impact of CD52 on the obesity pathology. Expression of CD52 was specifically increased in the visceral fat of obese mice. TNFalpha and IL1beta expressions were increased in the liver of obese CD52-deficient mice. The expression of IFNgamma showed an increasing tendency in the visceral adipose tissue. Impaired glucose tolerance was observed in the CD52 knockout mice. Flow-cytometric analysis showed no changes in CD4- and CD8-positive T cells in the spleen and CD52 receptor Siglec-G in the macrophage of visceral adipose tissues. Thus, CD52 is the key factor involved in the suppression of obesity progression to keep adipose tissue healthy, and it exerts the effect by controlling chronic inflammation via mechanisms affecting the adipose-hepatic function.

研究分野：糖尿病・内分泌

キーワード：未病 2型糖尿病 肥満 慢性炎症 エネルギー代謝 SiglecG

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は2型糖尿病や非アルコール性脂肪性肝疾患などの代謝疾患を誘発するが、その発症の鍵を握るのが脂肪組織や肝臓における慢性炎症である。近年、その病態進展機序の根幹が、Th1細胞やM1-マクロファージ(MΦ)などの「炎症性細胞」の増加と、Th2細胞、制御性T細胞(Treg)、M2-MΦなどの「抗炎症性細胞」の減少による免疫系バランスの欠如であることが明らかになった。特に、制御性T細胞(Treg)による脂肪組織の慢性炎症の抑制は肥満マウスの糖代謝を改善することから、肥満病態の改善における炎症抑制システムの意義が重要視されている。しかし、脂肪組織の慢性炎症には多様な免疫細胞が異なる時期に複合的に関与するため、肥満病態の進展機序は不明であり、免疫系を標的とした肥満病態への治療介入法の開発や介入時期の解明が課題とされている。

我々の研究グループでは、閉経肥満モデルマウスの内臓脂肪組織トランスクリプトームの網羅的生体情報を基にした数理的解析により、肥満病態の進展過程の最初期に関わる因子としてCD52を同定した。近年、CD52は免疫抑制に関わる新規機能が発見され、注目されている糖タンパク質である。CD52はT細胞から可溶化し遊離した後、その受容体であるシアル酸受容体Siglec-10(マウスではSiglec-G)に結合し、免疫応答を抑制的に制御する。1型糖尿病発症に関わる自己免疫性膵島炎に関連し、1型糖尿病患者とそのモデルマウスではCD52高発現型CD4陽性T細胞が減少することが報告され、臨床的にもCD52の免疫抑制能の重要性が示されている。さらに近年、CD52のより幅広い炎症抑制能やその機構が報告されている。しかし、肥満に伴う代謝疾患の発症におけるCD52の役割は不明である。したがって、CD52が、単独またはTregなどの抗炎症性細胞と協調的に、肥満病態の進展を防止する可能性を検証することは、代謝疾患の新規治療戦略の構築に繋がる。

## 2. 研究の目的

肥満は、摂取したエネルギーを貯蔵する生体機能の表現型の一つであり、肥満自体(特に皮下脂肪肥大型肥満)は代謝疾患と同一ではない。「健常な」代謝機能は、肥満に伴い不安定化して「未病」状態となり、さらに機能障害が常態化し「病態」発症へ進展する。上述のように、その進展を防止するためには、内臓脂肪組織の炎症-抗炎症バランスを抗炎症側へシフトさせる免疫抑制システムが鍵を握っている。しかし、その機構の全容は不明である。そこで本研究では、最近、免疫抑制機能が新たに同定されたCD52に焦点を当て、肥満病態における機能的意義を解明する。そのために、実験動物(マウス)が肥満する過程において、CD52の増加や欠如が内臓脂肪の慢性炎症や全身の代謝機能に及ぼす影響を検証し、肥満病態におけるCD52の存在意義を解明する。本研究成果により、CD52を標的とした肥満に伴う代謝疾患に対する新規介入法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 雌性 CD52<sup>+/-</sup>マウスの検討

8週齢の雌性WTおよびCD52<sup>+/-</sup>にそれぞれ卵巣摘出手術(OVX)を行い1週間の回復期間を設けた。9週齢から高脂肪食を16週間負荷(OVX-HFD)、または偽手術(sham)を行い通常食で同期間飼育し(sham-chow)、4群(WT-sham-chow, CD52<sup>+/-</sup>-sham-chow, WT-OVX-HFD, CD52<sup>+/-</sup>-OVX-HFD)のマウスを作製した。

## 2) 雌性および雄性 CD52<sup>-/-</sup>マウスの検討

8 週齢雌性の WT および CD52<sup>-/-</sup> に OVX を行い、HFD を 12 週間負荷した。また、8 週齢雄性の WT および CD52<sup>-/-</sup> に HFD を 12 週間負荷した。

## 3) グルコース負荷試験 (GTT)とインスリン負荷試験 (ITT)

GTT では、マウスを 6 時間絶食後、2 g/kg のグルコースを腹腔内投与した。0, 15, 30, 60, 120 分後に尾静脈より採血し、血糖値を測定した。ITT では、マウスを 4 時間絶食後、0.75 U/kg のインスリンを腹腔内投与した。0, 15, 30, 60, 120 分後に尾静脈より採血し、血糖値を測定した。

## 4) 解剖

マウスを over night で絶食した。マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、性腺周囲白色脂肪組織 (内臓脂肪組織)、肝臓および脾臓を採取した。

## 5) フローサイトメトリー

マウス内臓脂肪組織の間質血管細胞分画 (SVF) の細胞浮遊液作成

RPMI+2% FBS に振盪した内臓脂肪組織を、Type 1 collagenase / HBSS を用いて細かくミンスした後、37°C の恒温槽で 45 分間孵置した。メッシュを通し RPMI+2% FBS を添加した後、遠心 (1500 rpm, 24°C, 10 min) した。その後上清を除き、Lysing buffer を加えてペレットを溶解した。15 分間反応させた後、RPMI+2% FBS を加え再度メッシュを通した。遠心 (1500 rpm, 24°C, 10 min) して上清を除き FACS buffer (1% BSA) で懸濁した。

マウス脾細胞の細胞浮遊液作成

FACS buffer に浸しておいた脾臓をすりガラスで潰し、メッシュを通した。遠心 (1500 rpm, 4°C, 10 min) し、上清を除いた。Lysing buffer を加え、1 分間反応させた。FACS buffer により懸濁した後、遠心 (1500 rpm, 4°C, 10 min) した。上清を除き FACS buffer で懸濁した後、再度メッシュを通し、FACS buffer を用いて細胞浮遊液を作成した。

抗体染色

セルカウントにより、96 穴プレートに  $2.5 \times 10^5$  cells ずつアプライした。FACS buffer で 2 回洗浄した後、Fc block (Anti-Mo CD16/CD32) を加えた。15 分、4°C で反応させた後、単染色および Mixture Antigen を加えた。20 分、4°C で反応させた後、FACS buffer で洗浄した。最後に、7-AAD を 15 分反応させて FACSCantoII フローサイトメーターを用いて解析した。

## 6) RNA の抽出とリアルタイム PCR

Total RNA を抽出した後、各サンプルの RNA 量を NanoDrop ND-2001 で測定し、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を用い、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix with low ROX によるリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR は Mx3000p QPCR システムにて、Segment 1 (95°C 10 min) ×1 サイクル、Segment 2 (95°C 10 sec, 62°C 20 sec, 72°C 15 sec) ×40-50 サイクル、Segment 3 (95°C 1 min, 55°C 30 sec, 95°C 30 sec) ×1 サイクルの条件で行った。結果は 18s rRNA の mRNA 発現で補正した。

## 4. 研究成果

### 1) 高脂肪食負荷による CD52 の発現変化

高脂肪食を4か月間負荷した雄性マウスは、内臓脂肪蓄積に伴う体重増加、耐糖能障害、インスリン抵抗性を示した。本肥満マウスの内臓脂肪では、CD4<sup>+</sup>T 細胞の減少と CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加が認められ、mRNA 発現解析でもマクロファージおよび炎症性マクロファージの指標である F4/80 と CD11c、および炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  と IL1 $\beta$  の増加を認めた。興味深いことに、炎症抑制能が期待される CD52 の発現は、肥満の内臓脂肪組織で上昇した。よって、CD52 は肥満病態の進展に関わる慢性炎症に対し、防御的に機能する可能性が示された。同様の知見は、雌性マウスの卵巣を摘出し高脂肪食を16週間負荷した閉経肥満モデルマウスでも得られた。本研究での肥満特異的な CD52 の発現変化は内臓脂肪組織に特異的であり、骨格筋や肝臓では発現変化を認めなかった。

## 2) 雄性 CD52 欠損マウスの体重変化

CD52<sup>-/-</sup>マウスおよび野生型マウスの体重は、通常食および高脂肪食(HFD)負荷ともに差異を認めなかった。また解剖時の内臓脂肪組織 (eWAT)、褐色脂肪組織 (BAT)、および腓腹筋 (Soleus) の各組織重量も CD52 欠損により変化を示さなかった。

## 3) 雄性マウスでの CD52 欠損が耐糖能とインスリン感受性に与える影響

CD52 欠損 HFD 負荷マウスはコントロールマウスに対し有意な空腹時血糖の上昇を認めた。しかし、GTT および ITT では通常食、高脂肪食負荷とも Genotype 間に有意な変化を認めなかった。

## 4) 雄性マウスでの CD52 欠損が脾臓の T 細胞に与える影響

マウスの脾臓に局在する、CD52 を発現する T 細胞をフローサイトメトリーにて検討した。CD4<sup>+</sup>CD52<sup>+</sup>細胞および CD8<sup>+</sup>CD52<sup>+</sup>細胞は、CD52 欠損マウスでは有意に減少した。CD45<sup>+</sup>細胞中の CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合には CD52 欠損による影響を認めなかったことから、T 細胞の成熟に対する CD52 の関与は低いと考えられた。その一方で、CD52 の受容体である SiglecG 陽性 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞数はともに HFD 負荷群で低下傾向を示したが、genotype 間では有意な差を認めなかった。

## 5) 雄性マウスでの CD52 欠損が内臓脂肪組織および肝臓の慢性炎症に与える影響

内臓脂肪組織の炎症性サイトカインおよび炎症・抗炎症マクロファージの発現をリアルタイム PCR にて検討した。HFD 負荷により *F4/80*、*Cd11c*、*Tnfa* の mRNA 発現は増加し、*Cd206* の発現は減少した。しかしこれらの発現に Genotype 間で差異を認めなかった。その一方で、*Ifng* の発現は通常食、HFD 負荷のいずれにおいても CD52 欠損マウスで増加する傾向を認めた。しかし肝臓においては、*Ifng* の発現に変化を認めず、CD52 欠損 HFD マウスでは *Tnfa* と *Il1b* 発現の増加および *Cd206* の mRNA 発現の減少傾向を示した。

## 6) 雌性マウスでの CD52 欠損の影響

雌性マウスにおいてもおよそ雄性と同様の影響を認めたが、CD52 欠損 HFD 負荷マウスは空腹時血糖に影響を認めなかったのに対し GTT の 30, 60 分値の血糖は上昇した。また肝臓における *Cd206* の発現は変化を示さなかった。

本研究により、肥満病態における CD52 の慢性炎症制御機構は内臓脂肪組織と肝臓では異なると考えられ、脂肪組織ではインターフェロン  $\gamma$  産生に関わる T 細胞や ILC 1 細胞、肝臓ではマクロファージやクッパー細胞に対する免疫調整作用を示す可能性が考えられた。以上より、CD52 は未病因子として肥満病態の進展抑制に関わり、その機序として脂肪-肝組織連関を介して慢性炎症の制御効果を発揮することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka T, Wada T, Uno K, Ogihara S, Ie H, Okekawa A, Ishikawa A, Ito T, Miyazawa Y, Sameshima A, Onogi Y, Tsuneki H, Sasahara M, Nakashima A, Saito S, Sasaoka T.	4. 巻 64
2. 論文標題 Oestrogen receptor in T cells controls the T cell immune profile and glucose metabolism in mouse models of gestational diabetes mellitus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 1660-1673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-021-05447-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miyazawa Y, Wada T, Tsuneki H, Sasaoka T.
2. 発表標題 Transdermal application of MC903 ameliorated diet-induced obesity by increasing energy expenditure and muscle fiber thickness in mice.
3. 学会等名 The 19th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村楓花, 和田 努, 桶川 晃, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 内臓脂肪組織におけるペリサイトの脱離を介した脂肪肝細胞の増殖・分化メカニズム.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮澤佑一朗, 和田 努, 王生美沙, 布施健人, 塩練久史, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 MC903塗布による肥満マウスの病態改善機構の解明.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桶川 晃, 和田 努, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態エネルギー代謝調節機構に対するペリサイトPDGFシグナルの重要性.
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田 努, 田中智子, 叶 喬博, 恒枝宏史, 中島彰俊, 齋藤 滋, 笹岡利安.
2. 発表標題 妊娠糖尿病病態におけるT細胞エストロゲン作用の重要性.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹岡利安, 恒枝宏史, 和田 努.
2. 発表標題 炎症細胞による脂肪組織のリモデリング.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桶川 晃, 和田 努, 北村楓花, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 ペリサイトPDGFシグナルを介した視床下部慢性炎症とエネルギー代謝制御機構.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中智子, 宇笠生美恵, 荻原沙季, 叶 喬博, 石川明香里, 伊藤哲生, 宮澤佑一朗, 鮫島 梓, 小野木康弘, 恒枝宏史, 齋藤 滋, 中島彰俊, 笹岡利安.
2. 発表標題 妊娠糖尿病態マウスにおけるエストロゲンのT細胞を介したインスリン分泌促進・慢性炎症抑制作用.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹岡利安.
2. 発表標題 糖尿病における睡眠障害の病態と対策.
3. 学会等名 54回糖尿病学の進歩(Web開催)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊愛理, 和田 努, 桶川 晃, 北村楓花, 小野木康弘, 宮澤佑一朗, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 SDF1による脂肪組織血管新生に関わる細胞間クロストークの制御機構の解明.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会(Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桶川 晃, 和田 努, 小野木康弘, 稲田健人, 渡邊愛理, 小松 剛, 北村楓花, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態における視床下部PDGFシグナルが中枢性エネルギー代謝調節機構に与える影響の解析.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会(Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田 努, 長谷川颯, 渡辺志朗, 守田雅志, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 脂肪肝進展におけるペルオキシソームの極長鎖脂肪酸トランスポーターの意義.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中智子, 和田 努, 宇埜生美恵, 荻原沙希, 石川明香里, 伊藤哲生, 宮澤佑一朗, 鮫島 梓, 小野木康弘, 恒枝宏史, 齋藤 滋, 笹岡利安.
2. 発表標題 T細胞のエストロゲン作用消失はTh17増加に伴い妊娠糖尿病病態を示す.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹岡利安.
2. 発表標題 中枢性エネルギー代謝の概日リズム制御による糖尿病合併症の治療戦略.
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会 (Web開催) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wada T, Onogi Y, Okekawa A, Matsuzawa T, Watanabe E, Komatsu G, Tsuneki H, Sasaoka T.
2. 発表標題 Intracellular metabolism-dependent PDGE-B induction in inflammatory macrophages contributes to adipose tissue expansion with obesity.
3. 学会等名 American Diabetes Association (ADA) 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 桶川 晃, 和田 努, 小野木康弘, 松澤崇俊, 渡邊愛理, 小松 剛, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態におけるマクロファージ細胞内代謝プログラム変化依存的なPdgfb発現誘導機構の解析.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川明香里, 和田 努, 伊藤哲生, 田中智子, 宇堃生美恵, 西村燦志朗, 齋藤 滋, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満マウスの内臓脂肪組織における制御性T細胞局在変化の雄雌差とそのメカニズムの解析.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中智子, 和田 努, 宇堃生美恵, 荻原沙希, 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.
2. 発表標題 T細胞ER 欠損が妊娠糖尿病病態におよぼす影響の解析.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊愛理, 和田 努, 小野木康弘, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態におけるペリサイトの動的変化に対するSDF1シグナルの意義.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桶川 晃, 和田 努, 小野木康弘, 稲田健人, 渡邊愛理, 小松 剛, 北村楓花, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態における中枢性エネルギー代謝調節へのPDGFシグナルの関与.
3. 学会等名 第19回日本内分泌学会北陸支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桶川 晃, 和田 努, 小野木康弘, 稲田健人, 渡邊愛理, 小松 剛, 北村楓花, 恒枝宏史, 笹岡利安.
2. 発表標題 肥満病態における中枢性エネルギー代謝調節へのPDGFシグナルの関与.
3. 学会等名 第19回日本内分泌学会北陸支部学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学 学術研究部 (薬学・和漢系) 病態制御薬理学研究室 ホームページ <a href="http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html">http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 努  (WADA TSUTOMU)  (00419334)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・講師    (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	恒枝 宏史  (TSUNEKI HIROSHI)  (20332661)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授     (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関