

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：83206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09019

研究課題名(和文) 自然免疫シグナルTRIF経路を介した視床下部炎症による摂食調節異常機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of TRIF-mediated innate immune signaling in hypothalamic inflammation-induced dysregulation of food intake

研究代表者

渡邊 康春 (Watanabe, Yasuharu)

富山県薬事総合研究開発センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：80646307

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)：近年、自然免疫センサーToll様受容体(TLR)4とそのアダプター分子MyD88によって誘導される視床下部の炎症反応が、摂食抑制ホルモン(レプチン)のシグナルを障害し過食になることが報告されている。我々は、TLR4-MyD88やTLR3非依存的なTLRのアダプター分子TRIFシグナルが、視床下部炎症に関与し、摂食調節異常を誘導することを見出した。また、DNAウイルス感染に対応する自然免疫シグナルのアダプター分子STINGが、TRIF依存的に視床下部炎症に関与しレプチンシグナルを障害することから、STING-TRIF経路が視床下部炎症に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで考えられているTLR4-MyD88経路よりもSTING-TRIFシグナル経路が、視床下部炎症に深く関与することを見出した。今後STING-TRIFシグナルを誘導する上流分子や責任細胞の同定により、摂食調節異常の新規メカニズムを提唱でき、自制が困難な過食性肥満の解明に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Recent accumulating evidence suggests that toll like receptor 4 (TLR4) and the adaptor protein MyD88 induce hypothalamic inflammation, which inhibits leptin-induced anorexia and promotes hyperphagia, obesity, and metabolic syndrome.

We found that TLR4-MyD88- and TLR3-independent TLR adaptor protein TRIF signaling pathway was involved in high-fat diet (HFD)-induced hypothalamic inflammation and hyperphagia. TRIF-dependent STING signaling, adaptor protein in the cytosolic DNA sensing pathway, induced hypothalamic inflammation and impaired leptin signaling in hypothalamus. These results suggested that STING-TRIF signaling contributes of hypothalamic inflammation and leptin resistance under HFD treatment.

研究分野：免疫学

キーワード：視床下部炎症 自然免疫 肥満

1. 研究開始当初の背景

肥満に伴うメタボリック症候群の進展・増悪には、病原体センサーである Toll 様受容体 (TLR) の活性化による慢性炎症が関与することがわかってきた。TLR は、病原体以外にも死細胞や組織障害由来の分子や代謝産物も内因性リガンドとして認識し、重要なシグナル伝達経路である MyD88 経路と TRIF 経路の両方、またはどちらか一方を利用して、死細胞のクリアランスや組織修復などに関与する。しかし、肥満に伴う内因性リガンドの量や質の変化は、様々な臓器 (内臓脂肪組織、膵臓、肝臓、骨格筋など) で炎症反応を惹起・増悪し、インスリンシグナルなどの代謝制御シグナルを障害して糖尿病の病態形成を誘導する。

近年、高脂肪食によってミクログリアの浸潤やアストロサイトの増殖により、視床下部にも炎症反応が誘導され、レプチンのシグナルを障害して、摂食が抑制できず過食になることが、肥満を助長し且つ脱却を難航させる原因の 1 つとして考えられている (Thaler et al., J Clin Invest, 2012)。さらにその視床下部炎症には、TLR4 が飽和脂肪酸により活性化され、MyD88 を介してシグナルを誘導することが報告されている (Milanski et al., J Neurosci, 2009)。また、TLR 下流のシグナル分子である IKK β /NF- κ B が、視床下部炎症によるレプチンシグナルの障害に関与することから (Douglass et al., Mol Metab, 2017; Zhang et al., Cell Metab, 2017)、TLR4-MyD88-IKK β /NF- κ B 経路による視床下部炎症が、レプチンシグナルの障害を誘導すると考えられてきた。

しかし、中枢神経特異的な MyD88 欠損マウスでは、高脂肪食摂餌による視床下部炎症が完全に抑制されない (Kleinridders et al., Cell Metab, 2009)。従って、MyD88 経路以外の視床下部炎症の誘導機序が示唆されているが、その詳細はわかっていない。

2. 研究の目的

我々は、これまで報告されている TLR4-MyD88 シグナルとは異なる機序で、自然免疫センサーのシグナル伝達分子 TRIF が視床下部炎症に関与し、摂食調節異常を誘導して、過食性肥満の発症に深く関与することを見出している。TRIF 欠損マウスは、摂餌量が減少し、高脂肪食誘発性の肥満が軽減した。さらに TRIF 欠損マウスは、高脂肪食摂餌による視床下部炎症が抑制され、レプチンの摂食抑制作用の障害が軽減することがわかった。また、TLR4 欠損マウスと MyD88 欠損マウスの摂餌量は、野生型マウスと同程度であり、TRIF 欠損マウスの表現型とは明らかに異なっている。以上から、TRIF シグナルは視床下部炎症の主要な経路であり、TLR4 非依存的にレプチンシグナルを障害して過食性肥満を誘導すると考えられる。

TRIF シグナルを誘導する上流の TLR は、TLR4 と TLR3 のみであることが知られている。また、TLR4 欠損マウスの表現型は TRIF 欠損マウスと異なることから、TLR3 が TRIF シグナルを活性化し、視床下部炎症や摂食調節異常の誘導に関与すると想定される。一方、DNA ウイルス感染に対応する自然免疫シグナルのアダプター分子 STING (stimulator of interferon genes) が、TRIF を介してウイルス感染防御に関与していることが報告されている (Wang et al, Cell Host Microbe, 2016; Takashima et al, BBRC, 2018)。従って、視床下部炎症を誘導する TRIF シグナルの上流分子として、TLR3 と STING が想定される。さらに既記のように、視床下部炎症にはミクログリアの浸潤やアストロサイトの増加が関与することが報告されている。

以上から我々は、次の新規メカニズムを推定している。高脂肪食摂餌により、TLR3 または STING を介してミクログリアまたはアストロサイトの TRIF シグナルが活性化し、視床下部炎症を惹起することでレプチンシグナルが障害され、摂食が抑制されず過食性肥満を誘発する。

本研究では、上記仮説を検証するため次の 3 点を明らかにする。

- (1) TLR3-TRIF 経路による摂食調節異常の解析
- (2) STING-TRIF 経路による視床下部炎症および摂食調節異常の解析
- (3) 視床下部における TRIF 発現細胞の同定

3. 研究の方法

(1) TLR3-TRIF 経路による摂食調節異常の解析

視床下部において、TLR3 遺伝子が発現していることを確認しており、視床下部における TLR3 の機能的な重要性が推察される。そこで野生型マウス、TRIF 欠損マウス、TLR3 欠損マウス、TLR3/4 二重欠損マウスに高脂肪食を摂餌させ、TRIF 欠損マウス同様に、野生型マウスより体重の軽減や摂餌量の減少、視床下部炎症の軽減が認められるのか解析した。また、代謝ケージにより、3 日間の酸素消費量および二酸化炭素排出量を測定し代謝能を解析した。

(2) STING-TRIF 経路による視床下部炎症および摂食調節異常の解析

野生型マウスに普通食または高脂肪食を 12 週間摂餌させて、視床下部における STING の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。

視床下部の STING シグナルは、TRIF に依存するのかが検討した。STING 合成リガンド DMXAA を野生型マウスおよび TRIF 欠損マウスに脳室内投与し、6 時間後に視床下部を採取した。RNA

を精製後、炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により解析した。DMXAA を野生型マウスおよび TRIF 欠損マウスに脳室内投与後 6 時間後にレプチンを脳室内投与し、45 分後に視床下部を採取した。レプチン投与による STAT3 のリン酸化が、DMXAA 投与より軽減するのかわスタンプロット法により解析した。

STING 欠損マウスに高脂肪食を摂餌させて、TRIF 欠損マウスと同様に、摂餌量の軽減し、体重増加が軽減するのかわ解析した。また、高脂肪食摂餌 12 週間後に、視床下部を採取し、視床下部の炎症が軽減するのかわリアルタイム PCR 法により解析した。

(3)視床下部における TRIF 発現細胞の同定

TRIF 発現細胞を *in situ* hybridization 法で検出し、さらにアストロサイト特異的マーカー、ニューロンのマーカーで多重染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4 . 研究成果

(1) TLR3-TRIF 経路による摂食調節異常の解析

TRIF 欠損マウスでは、野生型マウスよりも高脂肪食摂餌が減少し、肥満が改善していた。一方、TLR4 欠損マウスの高脂肪食摂餌量は、野生型マウスと同程度であり、体重も軽減しなかった。TLR3 欠損マウスは、高脂肪食摂餌による体重増加が軽減したが、摂餌量や酸素消費量は野生型マウスと同程度であった。TLR3/4 二重欠損マウスは、摂餌量や体重は軽減しなかった。

以上より、TLR3 欠損マウス、TLR4 欠損マウス、TLR3/TLR4 の二重欠損マウスの表現型は、TRIF 欠損マウスの表現型とは異なっていることから TRIF シグナルを誘導し視床下部炎症の発症に関与する上流の分子として、TLR4 及び TLR3 は関与しないことが示唆された。

(2)STING-TRIF 経路による視床下部炎症および摂食調節異常の解析

STING 遺伝子が、マウス視床下部でも発現していることを確認した。しかし、TRIF の発現同様に、12 週間の高脂肪食摂餌による顕著な STING 遺伝子の発現変化は認められなかった。

さらに、STING 合成リガンド DMXAA の脳室内投与により、視床下部の炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6, IL-1 β)の遺伝子発現が増加し、TRIF 欠損マウスでは顕著に軽減した。また、レプチンの脳室内投与によるシグナル分子 STAT3 のリン酸化が、DMXAA の脳室内投与により軽減した。以上から、DMXAA の脳室内投与では、STING は TRIF シグナルを介して視床下部炎症を誘導し、レプチンシグナルを障害することが示唆された。そこで次に、STING 欠損マウスに高脂肪食を摂餌させ、体重の変化と摂餌量、視床下部炎症を解析した。

STING 欠損マウスは、高脂肪食摂餌が軽減し、体重増加が軽減することが分かった。また、高脂肪食摂餌によって増加する視床下部の炎症性サイトカインの遺伝子発現は、STING 欠損マウスでは軽減していた。

以上から、STING-TRIF 経路が視床下部炎症に関与し、摂食調節異常を誘導することが示唆された。

(3)視床下部における TRIF 発現細胞の同定

TRIF は、視床下部のアストロサイトの一部の細胞に発現していることがわかった。一方、NeuN 陽性の神経細胞には発現していなかった。オリゴデンドロサイトやミクログリアの免疫染色と *in situ* hybridization 法の二重染色条件を決定したが、発現解析に至らなかった。

<引用文献>

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW, Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans, *J Clin Invest*, 122(1):153-62, 2012.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA, Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity, *J Neurosci*, 29(2):359-70, 2009.

Douglass JD, Dorfman MD, Fasnacht R, Shaffer LD, Thaler JP, Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation, *Mol Metab*, 6(4):366-373, 2017.

Zhang Y, Reichel JM, Han C, Zuniga-Hertz JP, Cai D, Astrocytic Process Plasticity and IKK β /NF- κ B in Central Control of Blood Glucose, Blood Pressure, and Body Weight, *Cell Metab*, 25(5):1091-1102, 2017.

Kleinridders A, Schenten D, Könnert AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, Wunderlich FT, Medzhitov R, Brüning JC. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity, *Cell Metab*, 10(4):249-59, 2009.

Valdearcos M, Douglass JD, Robblee MM, Dorfman MD, Stifler DR, Bennett ML, Gerritse I, Fasnacht R, Barres BA, Thaler JP, Koliwad SK, Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility *Cell Metab*,

26(1):185-197, 2017.

Wang X, Majumdar T, Kessler P, Ozhegov E, Zhang Y, Chattopadhyay S, Barik S, Sen GC. STING Requires the Adaptor TRIF to Trigger Innate Immune Responses to Microbial Infection, *Cell Host Microbe*, 20(3):329-341, 2016.

Takashima K, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, TICAM-1 is dispensable in STING-mediated innate immune responses in myeloid immune cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 499(4):985-991, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ishibashi Riko, Furusawa Yukihiro, Honda Hiroe, Watanabe Yasuharu, Fujisaka Shiho, Nishikawa Miyu, Ikushiro Shinichi, Kurihara Shin, Tabuchi Yoshiaki, Tobe Kazuyuki, Takatsu Kiyoshi, Nagai Yoshinori	4. 巻 66
2. 論文標題 Isoliquiritigenin Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Syndrome by Modifying Gut Bacteria Composition in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition Food Research	6. 最初と最後の頁 2101119 ~ 2101119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.202101119	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 -

1. 著者名 Ogasawara Masaru, Yamasaki-Yashiki Shino, Hamada Masahiro, Yamaguchi-Miyamoto Tomomi, Kawasuji Toru, Honda Hiroe, Yanagibashi Tsutomu, Ikutani Masashi, Watanabe Yasuharu, Fujimoto Ryota, Matsunaga Takayuki, Nakajima Noriyuki, Nagai Yoshinori, Takatsu Kiyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Betulin Attenuates TGF- 1- and PGE2-Mediated Inhibition of NK Cell Activity to Suppress Tumor Progression and Metastasis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 339 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00921	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 -

1. 著者名 Morita Masashi, Kaizawa Taro, Yoda Taiki, Oyama Takuro, Asakura Reina, Matsumoto Shun, Nagai Yoshinori, Watanabe Yasuharu, Watanabe Shiro, Kobayashi Hiroshi, Kawaguchi Kosuke, Yamamoto Seiji, Shimozawa Nobuyuki, So Takanori, Imanaka Tsuneo	4. 巻 44
2. 論文標題 Bone marrow transplantation into Abcd1 deficient mice: Distribution of donor derived cells and biological characterization of the brain of the recipient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease	6. 最初と最後の頁 718 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jimd.12346	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 -

1. 著者名 Watanabe Yasuharu, Nagai Yoshinori, Honda Hiroe, Okamoto Naoki, Yanagibashi Tsutomu, Ogasawara Masaru, Yamamoto Seiji, Imamura Ryu, Takasaki Ichiro, Hara Hiromitsu, Sasahara Masakiyo, Arita Makoto, Hida Shigeaki, Taniguchi Shun'ichiro, Suda Takashi, Takatsu Kiyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 11821 ~ 11835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900477RR	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 石橋璃子、古澤之裕、本田裕恵、渡邊康春、藤坂志帆、戸邊一之、高津聖志、栗原新、田淵圭章、長井良憲
2. 発表標題 イソクイリチゲニンによる腸内細菌叢の変動を介したメタボリックシンドロームの改善
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊康春
2. 発表標題 Crosstalk between neutrophils and adipocytes exacerbates adipose tissue inflammation in progression of type 2 diabetes
3. 学会等名 第6回富山パーゼルジョインシンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Watanabe Yasuharu, Nagai Yoshinori, Takatsu Kiyoshi
2. 発表標題 Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation
3. 学会等名 The 104th Annual Meeting of The American Association of Immunologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊康春、長井良憲、高津聖志
2. 発表標題 TLRのアダプター分子TRIFを介した摂食調節異常・視床下部炎症の解析
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長井良憲、渡邊康春、高津聖志
2. 発表標題 内臓脂肪組織炎症における好中球と脂肪細胞のクロストーク
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊康春、長井良憲、高津聖志
2. 発表標題 好中球と脂肪細胞の相互作用は内臓脂肪組織の炎症を誘導する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山県薬事総合研究開発センター
<https://www.pref.toyama.jp/1285/kurashi/kenkou/iryuu/1285/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------