

機関番号：33303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790707

研究課題名 (和文) 全身性自己免疫疾患における肥満因子レプチンに関する研究

研究課題名 (英文) Research on leptin in systemic autoimmune disease

研究代表者

藤田 義正 (FUJITA YOSHIMASA)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：70450880

研究成果の概要 (和文) : MRL/lpr マウスをバックグラウンドとしたレプチン欠損マウスでは、SLE 病変の軽症化がみられた。またレプチンは *in vivo* において骨髄 B 細胞に対してストレス誘発アポトーシスを抑制した。これは B 細胞上のレプチン受容体を介する直接作用ではなく、内分泌代謝系などを介した間接的な作用によるものであること明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Lupus nephritis was ameliorated in leptin deficient MRL/lpr mice. Leptin inhibited stress-induced apoptosis of bone marrow B cells *in vivo*, through indirect effects such as endocrine and metabolic system.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：内科、免疫学

1. 研究開始当初の背景

栄養状態と免疫系とは密接に関連していることが知られており、低栄養状態では著明な免疫不全となり、感染症や悪性腫瘍の有意な増加をもたらすとされているが、その機序についてはいまだ十分に解明されていない [Chandra RK: Am J Clin Nutr 1997, Scrimshaw NS, SanGiovanni JP: Am J Clin Nutr 1997]。近年、単なる脂肪の貯蔵臓器と考えられていた脂肪細胞から TNF、PAI-1、adiponectin 等の多数の生理活性物質が産生されていることが発見され、脂肪組織による免疫系への調節機能が考えられるようになってきた [Zhang Y, et al: Nature 1994, Hotamisligil GS, et al: Science 1993]。1994

年フリードマンらは遺伝性肥満マウス (*ob/ob* マウス) のポジショナルクローニングにより肥満遺伝子産物 (レプチン) を単離同定した [Zhang Y, et al: Nature 1994]。レプチンは脂肪細胞から分泌される 16kDa のペプチドで、レプチンは肥満によって増加し、るいそうで減少する。現在のところレプチンは視床下部でレプチン受容体に結合して満腹中枢を刺激することによって食欲を抑制し、また末梢ではエネルギー産生を亢進させ、体重を減少させると考えられている。その一方で、レプチン受容体は末梢血 T 細胞や造血幹細胞にも発現が認められ、増殖因子としての作用や炎症性サイトカインの分泌、Th1 反応への促進作用など、レプチンが免疫系に対する多様な

モジュレーターとなっていることが報告されている [Lord GM, et al: Nature 1998]。

レプチンと免疫反応に関連した疾患については近年多くの報告がなされるようになった。臨床的には特に関節リウマチに関する報告が多い。関節リウマチ患者では血中レプチン濃度が健常者より高いとされている。また関節リウマチ患者滑液中のレプチン濃度は健常者より低値で、関節局所でのレプチン消費を示唆している [Otero M, et al: Ann Rheum Dis 2006]。しかし血中レプチン濃度と関節リウマチの活動性との相関性については相反するデータがあり、その評価はいまだ確定されたものではない [Popa C, et al: Ann Rheum Dis 2005]。また、全身性エリテマトーデスや強皮症など、その他の全身性自己免疫疾患においてはレプチンとの関連は全く不明である。

研究代表者は以前にマウスモデルを用いてレプチンの免疫系に及ぼす影響を検討し、栄養不良状態において、ストレスによるステロイドホルモンの増加とレプチンの減少によってリンパ球のアポトーシスが誘発され、リンパ球の減少を来し、免疫不全につながることを示した。また、低栄養状態およびステロイド投与におけるリンパ球減少はレプチン投与によって抑制されることが示された。レプチン受容体欠損マウス (*db/db* マウス) ではレプチン投与によってリンパ球数の回復を認めなかったため、これはレプチン受容体を介する作用と考えられた。またレプチントランスジェニックマウスではステロイド投与によるリンパ球減少に対して抵抗性を示した。さらにレプチンによって T cell hybridoma、胸腺細胞、脾細胞の *bcl-xL* の発現増加を認め、*bcl-xL* がレプチンの抗アポトーシス作用に関与している可能性が示唆された [Fujita Y, et al: Clin Exp Immunol 2002]。

これらの結果から、るいそう疾患や免疫不全状態に対するレプチンによる免疫機能の回復の可能性や、自己免疫疾患に対する抗レプチン療法の可能性が考えられる。

2. 研究の目的

自己免疫疾患に対する抗レプチン療法の可能性を検証するため、われわれは代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の自然発症モデルである *MRL/lpr* マウスを用い、レプチンシグナルの遮断を試みる研究を行ってきた。方法としては、*MRL/lpr* マウスとレプチン欠損マウスである *ob/ob* マウスあるいは、レプチン受容体欠損マウスである *db/db* マウスを戻し交配を繰り返すこと

により、*MRL/lpr* マウスをバックグラウンドとしたレプチン欠損マウスとレプチン受容体欠損マウスの作成に成功した。その結果、コントロールの *MRL/lpr* マウスと比較してレプチン欠損あるいはレプチン受容体欠損 *MRL/lpr* マウスにおいて、SLE 腎病変の改善や抗 dsDNA 抗体産生の抑制がみられた。また *MRL/lpr* マウスでは Fas 欠損によりアポトーシスが抑制され著明な異常リンパ球 (*lpr* 細胞) 増多がみられる。それに対してレプチン欠損および受容体欠損 *MRL/lpr* マウスではリンパ急増多が抑制され特に *lpr* 細胞の抑制が示された (2004 年日本リウマチ学会)。本研究では今後さらに研究を進めることにより全身性自己免疫疾患におけるレプチンの意義を解明していくことを目的とする。マウスモデルを用いた解析をさらに進めるとともに、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患患者におけるレプチンと病態との関係を解明していきたいと考えている。現在まで我々の preliminary な研究により *MRL/lpr* マウスに対するレプチン欠損・受容体欠損導入により、SLE 病変が修飾されることがすでに予想されている。従って、レプチン欠損・受容体欠損マウスをより *MRL/lpr* マウスのバックグラウンドに近づけ、腎病変や肺病変などの病理的な検討、自己抗体の測定、リンパ球サブセットの解析、サイトカイン測定などを通して、どのように SLE の病態や免疫異常とレプチンが関連しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) レプチン欠損・受容体欠損 *MRL/lpr* マウスの作成

すでに *MRL/lpr* マウスとレプチン欠損マウスである *ob/ob* マウスあるいは、レプチン受容体欠損マウスである *db/db* マウスを 3 回戻し交配を繰り返すことにより、*MRL/lpr* マウスをバックグラウンドとしたレプチン欠損マウスとレプチン受容体欠損マウスを作成しているが、よりマウスのバックグラウンドを *MRL/lpr* マウスに近づけるため、戻し交配を 10 回程度繰り返していく。戻し交配により作成されたらマウスの解析を行う。ヒトの SLE でみられる抗 DNA 抗体価や補体、免疫グロブリンを血清採取して測定する。また血清中のサイトカイン測定を ELISA で行う。測定系はいずれも当研究室ですでに日常的に使用されているものである。*MRL/lpr* マウスや NZB マウスは生後数ヶ月して SLE 病変を発症してくるため、経時的な測定を行い発症の過程での変化を捉えるようにする。さらに腎病変、肺病変、皮膚病変などの修飾を調べるため組織標本作製しコントロールマウスと比較する。腎病変の詳細な解析のため腎機能や尿

蛋白質の定量も行う。また、フローサイトメトリーでリンパ球サブセットを調べ末梢血、脾臓、胸腺、肝臓、腸管、骨髄、腹腔内のリンパ球異常とレプチン欠損による修飾を解析する。

(2) マウス骨髄B細胞のストレス誘発アポトーシスに対するレプチンの作用
マウスに対する acute starvation は、骨髄、脾臓におけるB細胞を減少させることが知られている。レプチン投与によりどのように修飾されるか検討する。

4. 研究成果

(1) レプチン欠損・受容体欠損 MRL/*Ipr* マウスの作成

レプチン欠損 MRL/*Ipr* マウスを作成し、MRL/*Ipr* マウスと SLE 病変を 5 カ月齢において比較した。

いずれのマウスでも抗 2 本鎖 DNA 抗体の上昇がみられたが、レプチン欠損 MRL/*Ipr* マウスでは抗体価が低い傾向がみられた。ただし有意差はみられずマウス数をさらに増やして検討を行っている。

レプチン欠損 MRL/*Ipr* マウスでは脾重量の低下がみられた。

レプチン欠損 MRL/*Ipr* マウスでは脾細胞数の減少、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD4CD8 陽性細胞、および *Ipr* 細胞の減少を認めた。レプチン欠損 MRL/*Ipr* マウスでは腎病理組織にて、メンサングウム領域の面積増加が抑制されていた。また、腎糸球体細胞数の増加が抑制されていた。

レプチン欠損 MRL/*Ipr* マウスでは血清クレアチニンの上昇が抑制されていた。

以上の結果から、レプチン欠損 MRL/*Ipr* マウスでは SLE 病変が軽症化すると考えられた。

(2) マウス骨髄B細胞のストレス誘発アポトーシスに対するレプチンの作用

マウスに絶食ストレスを与えると、アポトーシスにより著明な骨髄B細胞の減少が認められる。特に B220 陽性 IgM 陰性細胞に顕著である。

絶食中にレプチンを持続的に投与することにより、骨髄B細胞の減少が抑制され、レプチンによるアポトーシス抑制作用が認められた。

またレプチン欠損マウス、レプチン受容体欠損マウスでは骨髄B細胞が減少しており、B220 陽性 IgM 陰性細胞において顕著であった。一方、*in vitro* ではB細胞に対してレプチンによるアポトーシス抑制作用は認められなかった。

scid マウスにレプチン受容体欠損マウスの骨髄を移植したところ、コントロールマウス

をドナーとした場合と同様に正常なリンパ球の形成が認められた。

以上の結果から、マウス骨髄B細胞に対するレプチンのストレス誘発アポトーシスの抑制作用は、B細胞上のレプチン受容体を介した直接作用ではなく、内分泌代謝系や自律神経系などを介した間接的な作用によるものであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. *Arthritis Rheum.* 2010;62(12):3730-40. 査読有.

② Synergistic effects of topoisomerase I inhibitor, SN38, on Fas-mediated apoptosis. Cao Y, Jin ZX, Tong XP, Yue S, Sakai T, Kawanami T, Sawaki T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, Masaki Y, Fukushima Y, Fujita Y, Nakajima H, Okazaki T, Umehara H. *Anticancer Res.* 2010;30(10):3911-7. 査読有.

③ Complete response obtained by bortezomib plus dexamethasone in a patient with relapsed multiple myeloma with multiple plasmacytomas. Fukushima T, Nakamura T, Miki M, Sakai T, Iwao H, Nakajima A, Sawaki T, Fujita Y, Tanaka M, Masaki Y, Hirose Y, Umehara H. *Anticancer Res.* 2010;30(9):3791-4. 査読有.

④ Cisplatin augments FAS-mediated apoptosis through lipid rafts. Huang CR, Jin ZX, Dong L, Tong XP, Yue S, Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, Masaki Y, Fukushima Y, Tanaka M, Fujita Y, Nakajima H, Okazaki T, Umehara H. *Anticancer Res.* 2010;30(6):2065-71. 査読有.

⑤ Vaccination with autoreactive CD4(+)Th1 clones in lupus-prone MRL/Mp-Fas(*Ipr/Ipr*) mice. Fujii T, Okada M, Fujita Y, Sato T, Tanaka M, Usui T, Umehara H, Mimori T. *J Autoimmun.* 2009;33(2):125-34. 査読有.

⑥Aseptic meningitis in mixed connective tissue disease: cytokine and anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluids from two different cases. Fujita Y, Fujii T, Nakashima R, Tanaka M, Mimori T. Mod Rheumatol. 2008;18(2):184-8. 査読有.

[学会発表] (計3件)

①Fujita Y, Leptin protects B lymphocytes from starvation-induced apoptosis 14th International congress of immunology 平成22年8月24日. 神戸ポートピアホテル.

②藤田義正. 肥満物質(レプチン)のB細胞に対する抗アポトーシス作用 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成21年4月24日. グランドプリンスホテル新高輪.

③Fujita Y. Leptin protects B lymphocytes from starvation-induced apoptosis 第39回日本免疫学会総会・学術集会 平成21年12月4日. 大阪国際会議場.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 義正 (FUJITA YOSHIMASA)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：70450880