

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08214

研究課題名(和文) Th2細胞による脂肪細胞のエネルギー消費活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of Th2 lymphocyte-mediated energy expenditure in adipocytes

研究代表者

中江 淳(Nakae, Jun)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：00344573

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)：CD4陽性Tリンパ球特異的Foxo1ノックアウトFoxo3ヘテロノックアウトマウス(T-Quarter KO; T-QKO)では、Foxoの減少によりTh2リンパ球でのケモカイン受容体Ccr4遺伝子発現が増加し、ケモカインCcl22に対する感受性が増加することにより、脂肪細胞のベージュ化が促進する。一方、Ccl22は、寒冷刺激下において、皮下脂肪組織特異的に発現が誘導される。これにより、T-QKOの皮下脂肪にはより多くのTh2リンパ球がリクルートされることになり、ベージュ化に重要であると考えられているインターロイキン4、13(IL4、IL13)の産生を促進すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は、エネルギー摂取とエネルギー消費の過度の正のバランスにより発症し、現代における最大の栄養破綻病態である。現在、肥満予防・治療の方策の一つとして、エネルギー消費調節が脂肪細胞を中心に注目を集めている。本研究により、脂肪細胞のベージュ化過程にケモカインCcl22が関与する可能性が示唆された。今後は、Ccl22の生理的役割を明らかにするために、ノックアウトによるCcl22作用の抑制、および、Ccl22の過剰発現による抗肥満効果の有無を解析し、肥満の予防・治療戦略の新たな標的分子としての可能性を探る。

研究成果の概要(英文)：We generated thermogenic program-accelerating mice (T-QKO), in which Foxo1 is knockout and Foxo3 is hetero-knockout in CD4+ T cells. T-QKO exhibit lean phenotype under HFD due to increased energy expenditure. Cold exposure significantly increased expression of the thermogenic genes (Ppargc1a and Ucp1), Th2 cytokines (IL4 and IL13), and Th2 marker gene (Gata3) in subcutaneous adipose tissue (SC) of T-QKO. Furthermore, Ccr4 expression was significantly increased in Th2 cells of T-QKO, and cold exposure induced Ccl22 expression in SC, leading to increased accumulation of Th2 cell population in SC of T-QKO. These data reveal a mechanism by which cold exposure induces selective recruitment of Th2 cells into SC, leading to regulation of energy expenditure by generating beige adipocyte.

研究分野：肥満、2型糖尿病

キーワード：肥満 エネルギー消費 皮下脂肪組織 ベージュ脂肪細胞 Foxo Th2リンパ球 Ccl22

1. 研究開始当初の背景

肥満は、2型糖尿病をはじめとしたメタボリックシンドロームの基本病態であり、近年世界的に増加傾向が著しく、現代における最大の栄養破綻病態であり(Collaboration, 2016)、これは、小児の肥満においても同様である。さらに、小児期の肥満が成人におけるメタボリックシンドローム発症に関与しうることが指摘されており、成人のみならず小児期においても肥満の予防・治療方策を確立していくことは重要であり、その病態生理を分子レベルで解明していくことは急務である。

肥満は、エネルギー摂取とエネルギー消費の過度の正のバランスにより発症する。エネルギー摂取は、摂食量その他、高脂肪食をはじめとした高カロリー食の摂取により決定される。一方、エネルギー消費量は主に運動量により規定されると考えられている。現在の肥満予防・治療の中心は、食事・運動療法である。しかしながら、今後は摂食量および摂取カロリーの調節のみならず、エネルギー消費を活性化させることにより、肥満を予防・治療していくことも新たな戦略として期待される。

近年、エネルギー消費調節における脂肪細胞の役割が注目されている。すなわち、褐色脂肪細胞、Beige細胞といった脂肪細胞の熱産生によるエネルギー消費システムの提唱である(Kajimura et al., 2015)。現在、様々な分子がこの調節に関与していることが明らかにされてきているが、それぞれの分子の生体環境内の変化に応じた活性調節・発現調節に関するメカニズムの解明には至っていない。このメカニズムの解明は、単に創薬開発の標的分子を同定するのみでなく、食物・加齢・ストレスといった環境因子によるエネルギー消費の変化、調節を理解することにつながり、日常生活において、薬物に依存しない生活習慣の改変による新たな肥満予防方策を確立しうると考えられる。

参考文献

Collaboration, N.C.D.R.F. (2016). *Lancet* 387, 1377-1396.

Kajimura, S., Spiegelman, B.M., and Seale, P. (2015). *Cell Metab* 22, 546-559.

2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞によるエネルギー消費調節、特に免疫細胞との関連に着目する。その中で、インスリン、加齢、ストレスにより、鋭敏にその活性を調節できる **Foxo** ファミリー転写因子による免疫細胞の機能調節を介した脂肪細胞のエネルギー消費調節の新たなメカニズムを明らかにしていく。

白色脂肪細胞のベージュ化、褐色脂肪細胞の活性化には、現在、インターロイキン 4、13 (IL-4, IL-13) といった Th2 サイトカインの関与が指摘されている。これまで、その産生細胞である好酸球、ILC2 細胞がベージュ化に重要であることが報告されている。しかしながら、寒冷刺激などによる脂肪組織における免疫細胞の誘導メカニズムに関しては不明な点が多い。脂肪組織には、マクロファージはじめ T リンパ球など様々な免疫細胞が存在する。これらの免疫細胞の中で、**Foxo** が最も重要な生理的役割を持っている細胞は T リンパ球である。なぜならば、T リンパ球特異的 **Foxo** ファミリーノックアウトマウスは、生後 8 週より免疫異常を呈し、致死に至るからである。したがって、T リンパ球での **Foxo** ファミリーの発現量、活性の変化による糖・エネルギー代謝への影響を解析することは重要である。私たちは、T リンパ球特異的に **Foxo1** をノックアウト、および **Foxo3** をヘテロノックアウトすることにより、正常の T リンパ球で機能する **Foxo** ファミリー転写因子の量を 25% に減らすマウス (T-Quarter KO; T-QKO) を作製した。T-QKO は免疫異常を呈さず、T リンパ球の **Foxo** ファミリーの糖・エネルギー代謝調節における生理的役割を解析することが可能である。

3. 研究の方法

申請者はこれまでの解析で、T-QKO が酸素消費量を増加させ、高脂肪食負荷においても肥満を呈さないことを明らかにした。さらに、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織において Th2 サイトカイン、Th2 リンパ球特異マーカー遺伝子発現が有意に増加していることを明らかにした。以上のことから、脂肪組織への Th2 リンパ球の浸潤が増加していることが示唆された。本研究では、T-QKO の脂肪組織において Th2 リンパ球が増加する分子メカニズムを解明し、脂肪組織 T リンパ球における **Foxo** ファミリー転写因子の糖・エネルギー代謝制御における生理的役割を明らかにする。

(1) 臓器特異的 CD4+T リンパ球サブセットの解析

マウス高脂肪食負荷 T-QKO マウスにおける脾臓・末梢血・褐色脂肪組織・白色脂肪組織の FACS 解析による免疫細胞の cell population (Th1, Th2, Th17, Tfh 細胞) 変化を解析する。

(2) Th2 リンパ球における遺伝子発現変化の検討

脾臓から Th2 リンパ球分画 (CD4+CXCR3-CCR6-) を単離し、Th2 リンパ球特異的転写因子である

Gata3, I14, I113 遺伝子発現の検討を行い、CD4+T リンパ球における Foxo ファミリーの遺伝子発現に与える影響を検討する。

(3) Th2 リンパ球の homing 機能の検討

生体内のリンパ球は局所の炎症により、組織特異的に浸潤する。その際、ケモカイン-ケモカイン受容体システムが重要な役割を担う。Th2 リンパ球のケモカイン受容体として Ccr4 が知られている。本検討では、脾臓より FACS により単離した Th2 リンパ球における Ccr4 発現を比較検討する。

(4) 脂肪組織でのケモカイン遺伝子(Ccl17, Ccl22)発現の検討

Th2 リンパ球のケモカイン受容体 Ccr4 のリガンドとして知られるケモカインには、Ccl17 および Ccl22 がある。本検討では、皮下脂肪組織、内臓脂肪組織、および褐色脂肪組織の Ccl17 および Ccl22 発現を、普通食下の C57Bl6J コントロールマウスで検討し、その発現に組織特異的な相違があるかを検討する。次に、同コントロールマウスの普通食および高脂肪食下でのケモカイン発現変化を検討する。最後に、4℃、48時間飼育し、ケモカイン遺伝子発現の変化を検討する。

(5) ケモカイン発現細胞の同定

寒冷刺激によるケモカイン発現細胞を同定するため、樹状細胞、マクロファージ、血管内皮細胞マーカーである CD11c 抗体、CD206 抗体、MHCII 抗体、F4/80 抗体、VCAM-1 抗体と、有意に変化するケモカインの抗体との免疫蛍光組織染色を行い、産生細胞を同定する。

4. 研究成果

(1) 臓器特異的 CD4+T リンパ球サブセットの解析

T-QKO の脾臓・末梢血での T リンパ球サブセットは、Th2 リンパ球は有意に低下していた。それに対し、T-QKO の皮下脂肪組織では、Th2 リンパ球は有意に増加していた (図1)。それを、裏付けるように、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織全体での遺伝子発現解析では、Th2 リンパ球のマーカー遺伝子であるインターロイキン 4(I14)および 13(I113)の発現は有意に増加していた。

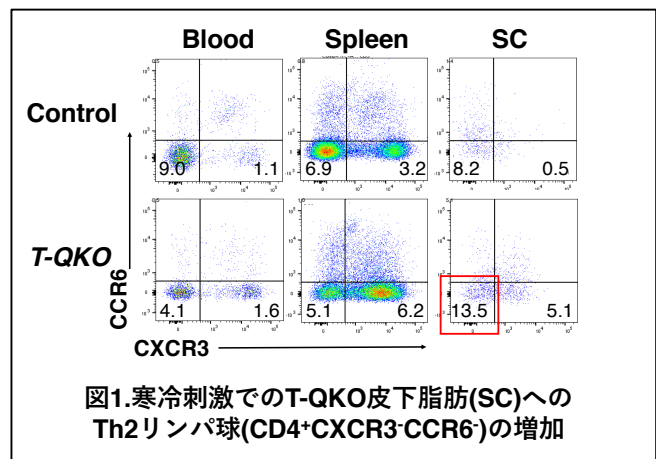


図1.寒冷刺激でのT-QKO皮下脂肪(SC)へのTh2リンパ球(CD4+CXCR3+CCR6+)の増加

(2) Th2 リンパ球における遺伝子発現変化の検討

脾臓より Th2 リンパ球分画 (CD4+CXCR3+CCR6-) を単離し、Th2 リンパ球特異的転写因子である Gata3, Ccr4 遺伝子発現の検討を行ったところ、Gata3, Ccr4 遺伝子発現が有意に増加していた (図2)。以上のことから、Foxo ファミリー遺伝子量の低下により、Gata3 遺伝子発現が増加し、Th2 リンパ球サブセットの増加に寄与し、さらに、その下流にあると考えられる Ccr4 遺伝子発現が増加することにより、皮下脂肪組織へのリクルートを増加させていると考えられた。

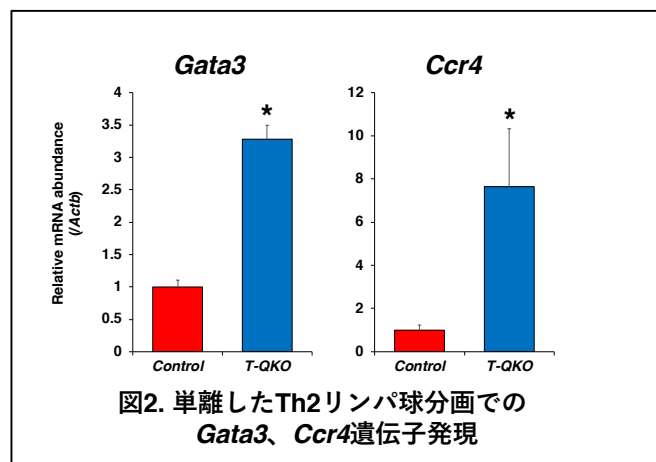


図2. 単離したTh2リンパ球分画でのGata3, Ccr4遺伝子発現

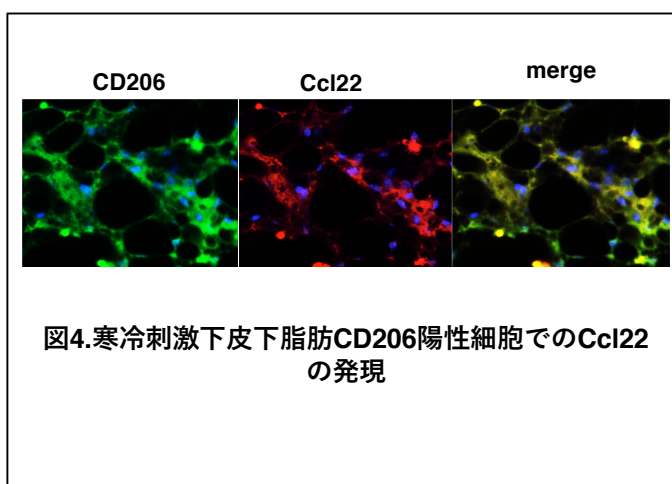
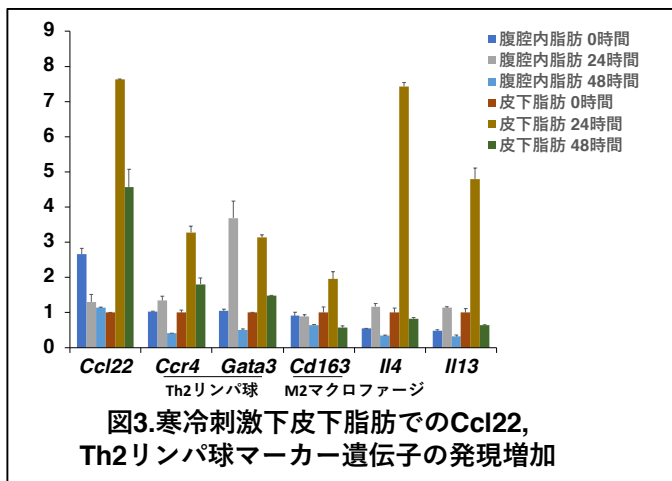
(3) 脂肪組織でのケモカイン遺伝子発現の検討

寒冷刺激下のマウスにおける皮下脂肪組織、腹腔内脂肪組織、褐色脂肪組織における Ccl22 遺伝子およびタンパクの発現について検討を行った。その結果、マウスを 4℃で飼育した際、Ccl22 遺伝子は、皮下脂肪組織特異的に発現が増加することが明らかになった。さらに、Ccl22 遺伝子発現増加に伴い、Th2 リンパ球マーカーの一つであるケモカイン受容体 Ccr4 遺伝子発現の増加が、皮下脂肪組織特異的に増加することが認められた (図3)。これは、これまで白色脂肪細胞のベージュ化に関与していると考えられてきた抗

炎症性マクロファージ、好酸球、Innate lymphoid cell type 2 (ILC2)の遺伝子マーカー発現の誘導が、皮下脂肪組織のみならず腹腔内脂肪組織でも認められるのと異なり、寒冷刺激による Cc122-Ccr4 システムの活性化が、皮下脂肪組織特異的であることが考えられ、白色脂肪組織のベージュ化に関与している可能性を示唆させた。

(4) ケモカイン発現細胞の同定

蛍光免疫染色により、Cc122 が M2 マクロファージのマーカーである CD206 発現細胞とマージしたことから、皮下脂肪組織において Cc122 が、CD206 陽性 M2 マクロファージより産生されることが示唆された (図4)。



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 4件）

1. 著者名 Niimi K, Nakae J, Inagaki S, Furuyama T.	4. 巻 37
2. 論文標題 FOXO1 represses lymphatic valve formation and maintenance via PRDM1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.110048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furuhata Ryogo, Kabe Yasuaki, Kanai Ayaka, Sugiura Yuki, Tsugawa Hitoshi, Sugiyama Eiji, Hirai Miwa, Yamamoto Takehiro, Koike Ikko, Yoshikawa Noritada, Tanaka Hiroto, Koseki Masahiro, Nakae Jun, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Suematsu Makoto	4. 巻 3
2. 論文標題 Progesterone receptor membrane associated component 1 enhances obesity progression in mice by facilitating lipid accumulation in adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01202-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hosooka Tetsuya, Hosokawa Yusei, Matsugi Kaku, Shinohara Masakazu, Senga Yoko, Tamori Yoshikazu, Aoki Chikako, Matsui Sho, Sasaki Tsutomu, Kitamura Tadahiro, Kuroda Masashi, Sakaue Hiroshi, Nomura Kazuhiro, Yoshino Kei, Nabatame Yuko, Itoh Yoshito, Yamaguchi Kanji, Hayashi Yoshitake, Nakae Jun, et al.	4. 巻 117
2. 論文標題 The PDK1-FoxO1 signaling in adipocytes controls systemic insulin sensitivity through the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11674~11684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1921015117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kodani Noriko, Nakae Jun	4. 巻 9
2. 論文標題 Tissue-Specific Metabolic Regulation of FOXO-Binding Protein: FOXO Does Not Act Alone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 702~702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9030702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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