

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591359

研究課題名(和文)メタボリック症候群病態形成における免疫プロテアソームの役割の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Role of the immunoproteasome in the pathogenesis of metabolic syndrome

研究代表者

木村 博昭(KIMURA, HIROAKI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70593622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は代謝異常をきたす危険因子である。炎症は肥満病態に関わっているが、未知の点が多い。蛋白質を分解する免疫プロテアソームサブユニットの一つであるLMP7は免疫システムにおいて重要で、リウマチや大腸炎・甲状腺炎などの炎症性疾患に関与する。肥満に炎症が関わることから、LMP7欠損マウスを利用して、肥満におけるLMP7の役割について検討した。LMP7欠損により、高脂肪食による肥満・内臓・皮下脂肪の蓄積、脂肪組織での炎症が抑制され、耐糖能なども改善された。これらの病態発現に、血球(免疫)細胞・組織細胞両方のLMP7が関与することがわかった。本研究により、LMP7が治療の対象となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Obesity increases the risk of developing metabolic disorders. The detailed pathogenic mechanism of inflammation in obesity is not fully understood. Low-molecular-mass polypeptide-7 (LMP7) is a proteolytic subunit of the immunoproteasome that plays a fundamental role in the immune system, and has been involved in the pathogenesis of several autoimmune diseases. We investigated the role of LMP7 in obesity using LMP7-deficient mice. LMP7 deficiency showed resistance to obesity, suppressed macrophage accumulation in adipose tissue, improved glucose tolerance, and suppressed serum triglyceride level elevation induced by high-fat diet (HFD) feeding, which increased fecal lipid contents. Using bone-marrow-transferred chimeric mice, we found that LMP7 in both hematopoietic and non-hematopoietic cells had critical roles in HFD-induced obesity development. These findings demonstrate that LMP7 in both hematopoietic and non-hematopoietic cells contributes to the pathogenesis of obesity.

研究分野：免疫学・内分泌学

キーワード：免疫プロテアソーム 肥満 高脂肪食 炎症 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満症や糖尿病などの生活習慣病は、急速に増加しつつあり、新規治療法や医薬品の開発をめざした生活習慣病の研究は世界中で盛んに行われている。各生活習慣病は関連性があり、内臓脂肪型肥満が起因となることが指摘されている。従って、生活習慣病を予防するには、生活習慣病が引き起こされやすい“メタボ”と呼ばれる病態を解明することが重要である。近年、このメタボリック症候群に免疫炎症反応が関わることがわかってきたが、未知な部分も多く、詳細な発症及び病態の機序の解明が求められている。

(2) 申請者は、2001年から2010年まで米国で、内分泌器官の自己免疫疾患の研究に携わり、世界的に患者数の多い自己免疫疾患、橋本病(慢性甲状腺炎)のモデルマウスの病態を解析し、免疫プロテアソームを欠損させることにより、病態が劇的に回復することを証明した。そこで、他の炎症モデルでも、免疫プロテアソームの発現・活性を制御することによって、劇的な病態改善が得られる可能性があると考え、申請者は慢性疾患の中でも、これから特に患者の増加が予想され、炎症が大きく関わっているメタボリック症候群に着目した。「慢性炎症」と「マクロファージ浸潤」という二つのキーワードと、米国での研究成果から、免疫プロテアソームがメタボリック症候群の病態で重要であるという仮説に至り、治療の標的になりうると考えた。

2. 研究の目的

内臓脂肪型肥満病態にどのような免疫分子が病態に関与しているのかを詳細に明らかにする。我々は、高脂肪食を与えたマウスの内臓脂肪において、炎症反応に重要な免疫プロテアソームの発現が亢進していることを見出した。本研究では、*in vivo* 動物モデル及び *in vitro* 細胞実験の両面から内臓脂肪炎症での免疫プロテアソームの役割を解明し、肥満症の予防法及び治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと免疫プロテアソームサブユニットの LMP2 もしくは LMP7 を欠損した雄マウスを実験に使用する。高脂肪食負荷による肥満・脂肪肝・高血糖のフェノタイプの違いを解析する。高脂肪食負荷前後の血清中総コレステロール・血清中トリグリセリド・空腹時の血糖値・インシュリン濃度、摂食量、体重増加、CT による皮下脂肪・内臓脂肪の定量、酸素消費量などの測定を行う。高脂肪食負荷 8 週間後に、マウスの肝臓・精巣上体の内臓脂肪・腎周囲脂肪・腸間膜脂肪・下肢の皮下脂肪を採取し、それらの重量を測定する。膵臓・腎臓・褐色脂肪も臓器サンプルとして採取する。肝臓は H&E による組織像と凍結切片作製に

より、Oil Red O 染色を行い、肝臓にどの程度脂肪が蓄積されているかを、組織像で判断する。採取した病態発現部位(内臓脂肪、膵臓、肝臓)の組織から mRNA やタンパク質を抽出し、炎症性サイトカインやケモカインの発現を real-time PCR、ウェスタンブロッティング、ELISA 等で定量し、野生型と LMP7 欠損マウスでの違いを検討する。ホルマリン固定した臓器でパラフィンブロックを作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色で組織像を観察し、免疫染色によりマクロファージや T 細胞などの免疫細胞を検出・比較する。新鮮な臓器より、コラゲナーゼを使って細胞を分散させて、フローサイトメトリーによりどのような免疫細胞が存在し、野生型と免疫プロテアソーム欠損マウスとの違いを比較検討する。

(2) 骨髄移植モデルを利用して、血球系と組織のどちらの免疫プロテアソームが病態発現に重要なかを上記の方法で検討する。

4. 研究成果

(1) 野生型と免疫プロテアソームのサブユニットの一つである LMP7 を欠損したマウスに高脂肪食負荷を行った。摂食量やエネルギー消費量が野生型とほぼ同じにも関わらず、LMP7 欠損マウスの体重増加は野生型に比べて顕著に抑制された(図1)。LMP7 欠損により、高脂肪食負荷

図1 高脂肪食投与による体重増加

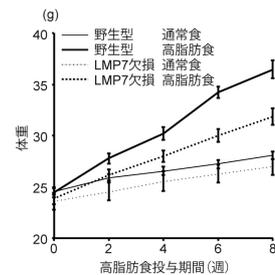


図2 高脂肪食負荷マウスの脂肪重量の比較

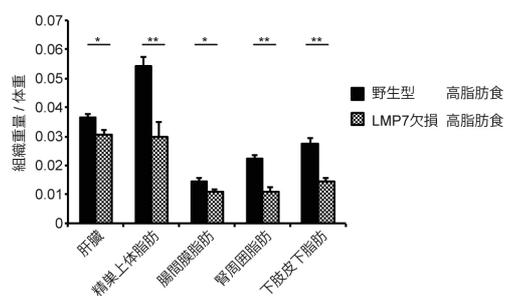
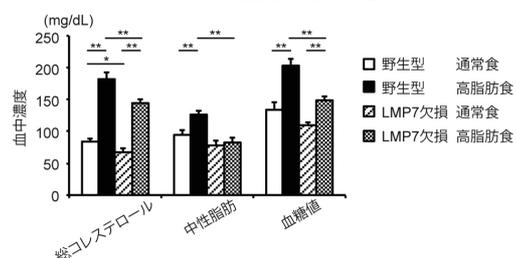


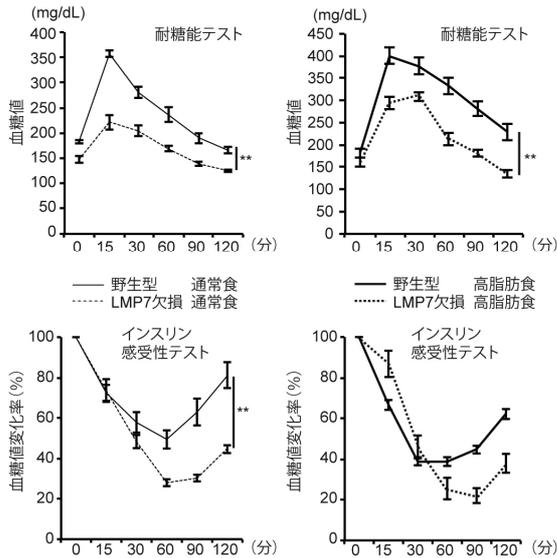
図3 総コレステロール・中性脂肪・血糖値の比較



によって増加した内臓脂肪（精巣上体・腸間膜・腎周囲）と下肢の皮下脂肪の蓄積が、野生型と比較して顕著に減少した（図2）。脂肪肝形成に顕著な差はなかった。高脂肪食負荷により上昇した血糖値や血清中の総コレステロール・中性脂肪も同様に減弱していることを見出した（図3）。

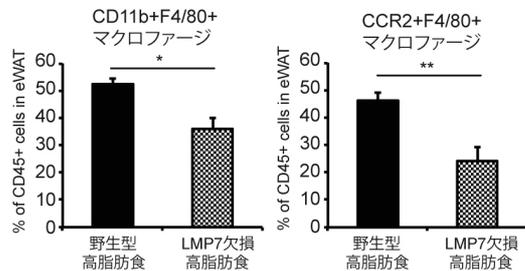
（2）LMP7欠損により、耐糖能が改善され、インスリンの感受性も改善された。高脂肪食投与したマウスでも改善もしくは改善の傾向が確認された（図4）。

図4 耐糖能とインスリン感受性の比較



（3）内臓脂肪における遺伝子発現を解析したところ、炎症性サイトカインの発現がLMP7欠損マウスで抑制されていた。内臓脂肪におけるマクロファージの浸潤を免疫染色で検討したところ、LMP7欠損マウスでは顕著に減少していた。さらに内臓脂肪におけるマクロファージをフローサイトメトリーで解析したところ、マクロファージ浸潤のなかでも、特にケモカイン受容体のCCR2陽性のマクロファージ浸潤が抑制されていることがわかった（図5）。

図5 精巣上体脂肪組織内白血球中のマクロファージ



（4）炎症反応において重要な役割を持っている血球系のLMP7と、組織側のLMP7のどちらが脂肪蓄積や体重増加に関わっているのかを、骨髄移植のモデルで検討したところ、両方とも重要であることがわかった（図6, 7）。

図6 骨髄移植キメラマウスの高脂肪食による体重増加の比較

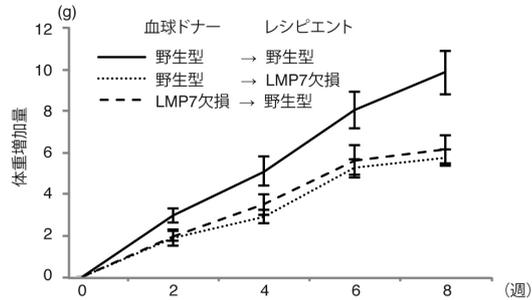
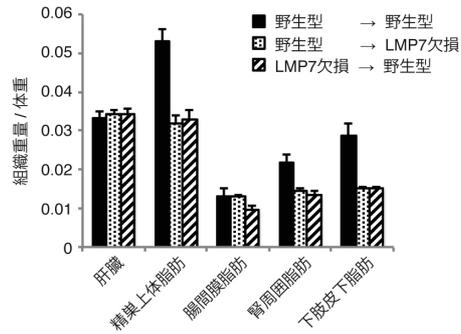


図7 骨髄移植キメラマウスの高脂肪食による脂肪重量の比較



（5）LMP2欠損マウスは繁殖が弱いため遅れているが、このマウスでも高脂肪食による肥満が抑制されることも見出している。

（6）LMP7欠損マウスの肥満モデルの解析について論文投稿中である。本研究によりLMP7が肥満症の治療の標的となることがわかった。今後、さらに他のメタボリック症候群の病態や糖脂質代謝における免疫プロテオソームの役割について研究を進める。

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14件)

Nanosilica-induced placental inflammation and pregnancy complications: Different roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC.
Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kimura H, Kawashima A, Mizukami H, Ohkuchi A, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Ozawa K, Taniguchi S, Takahashi M. *Nanotoxicology*. 2015 inpress 査読有

Mizushima Y, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Kobayashi M, Komada T, Inoue Y, Mato N, Yamasawa H, Latz E, Iwakura Y, Kasahara T, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi M. NLRP3

protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1. *J Biol Chem.* 2015;290(8):5065-77. doi: 10.1074/jbc.M114.603217. 査読有

Hara K, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Mizushima Y, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Matsuyama S, Kimura K, Takahashi M. Interferon-tau attenuates uptake of nanoparticles and secretion of interleukin-1 in macrophages. *PLoS One.* 2014;9(12):e113974. doi: 10.1371/journal.pone.0113974. eCollection 2014. 査読有

Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Yoshimura K, Aoki H, Tsutsui H, Noda T, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):127-36. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303763. 査読有

Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Dezaki K, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Iwakura Y, Tsutsui H, Taniguchi S, Yanagisawa K, Yada T, Yasuda Y, Takahashi M. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *J Immunol.* 2014;192(9):4342-51. doi: 10.4049/jimmunol.1302039. 査読有

Komada T, Usui F, Shirasuna K, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Kusano E, Takahashi M. ASC in Renal Collecting Duct Epithelial Cells Contributes to Inflammation and Injury after Unilateral Ureteral Obstruction. *Am J Pathol.* 2014 184(5):1287-98. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.014. 査読有

Iwama S, De Remigis A, Bishop JA, Kimura HJ, Caturegli P. Hürthle cells predict hypothyroidism in interferon-transgenic mice of different genetic backgrounds. *Endocrinology.* 2012;153(8):4059-4066. 査読有

Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Hida S, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and

development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425(2):162-168. 査読有

Usui F, Kimura H, Ohshiro T, Tatsumi K, Kawashima A, Nishiyama A, Iwakura Y, Ishibashi S, Takahashi M. Interleukin-17 deficiency reduced vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-induced apoE-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;420(1):72-77. 査読有

Kawashima A, Tanigawa K, Akama T, Wu H, Sue M, Yoshihara A, Ishido Y, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ, Hirano H, Kimura H, Sakai T, Ishii N and Suzuki K. Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity and suppress endocrine function in the thyroid. *Endocrinology.* 2011;152:1702-1712. 査読有

鈴木幸一、木村博昭 橋本病の病因. 日本甲状腺学会雑誌、京都、日本甲状腺学会、2013;4(1):14-18

木村博昭、鈴木幸一 肉芽腫-免疫を中心に-石井則久(編) Monthly Book Derma、東京、全日本病院出版会、2013;204 204:8-14 .

木村博昭、鈴木幸一 橋本病における遺伝子発現異常と病態. 森昌朋(編) カレントセラピー、名古屋、ライフメディコム、2013; 31 (1):71-75

鈴木幸一、川島晃、木村博昭 自己免疫性甲状腺疾患の病因・病態解明研究の最新動向. 日本臨床、大阪、日本臨床社、2012;70(11):1880-1884

〔学会発表〕(計 7件)

木村博昭、鈴木幸一、臼井文武、高橋将文、Noel R. Rose、Patrizio Caturegli. 免疫プロテアソームは慢性甲状腺炎に關与する. 第32回日本炎症・再生医学会. 2011年6月2-3日、京都.

木村博昭、鈴木幸一、高橋将文、Patrizio Caturegli. 甲状腺特異的IFN γ トランスジェニックマウスの慢性炎症発現はC57BL/6系統群に限られ、MHCハプロタイプに依存しない. 第52回日本甲状腺学会. 2011年11月21-23日、大阪

木村博昭、鈴木幸一、高橋将文、Patrizio Caturegli. 自己免疫性甲状腺炎の病態にお

ける免疫プロテアソームの関与.第85回日本内分泌学会、**シンポジウム**.2012年4月19-21日、名古屋市.

木村博昭、岩間信太郎、鈴木幸一、高橋将文、Patrizio Caturegli.甲状腺特異的IFN トランスジェニックマウスのHürthle細胞の出現と甲状腺機能低下は相関する.第53回日本甲状腺学会.2012年11月29日-12月1日、福岡市.

H. Kimura, K. Suzuki, S. Iwama, N.R. Rose, M. Takahashi, P. Caturegli. Reevaluation of mouse models of Hashimoto ' s thyroiditis. 第53回日本甲状腺学会、**橋本病100周年記念国際シンポジウム**「**甲状腺と自己免疫**」.2012年11月29日-12月1日、福岡市.

木村博昭、Shey-Cherng Tzou、Giovanni Pinna、Isabella Lupi、Melissa Landek-Salgado、高橋将文、Noel R. Rose、Patrizio Caturegli.自己免疫性下垂体炎の動物モデル.第39回日本神経内分泌学会、**シンポジウム**.2012年9月28-29日、北九州市.

木村博昭、川島晃、鈴木幸一、岩間信太郎、Patrizio Caturegli、高橋将文.LMP7 欠損マウスの甲状腺異常.第86回日本内分泌学会.2014年4月24~26日、福岡市.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.jichi.ac.jp/inflammation/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 博昭 (KIMURA, Hiroaki)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：70593622

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

高橋 将文 (TAKAHASHI Masafumi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：40296108