

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790942

研究課題名(和文) 生体の栄養センサー・レプチンによる炎症免疫調節の分子機構

研究課題名(英文) Role of leptin signaling in regulation of immune cell functions.

研究代表者

田中 都 (Tanaka, Miyako)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・メディカルフェロー

研究者番号：60622793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの基盤病態として全身の軽度の慢性炎症が指摘されている一方、飢餓や栄養不良の状態では、体脂肪量の減少とともに全身の免疫機能が低下し、易感染性を呈することが知られている。本研究では、肥満や痩せで大きく血中濃度が変化する脂肪細胞由来ホルモンのレプチンに着目し、レプチンが免疫応答や炎症反応を制御する可能性を検討した。絶食などによる低レプチン状態では、骨髄においてB細胞の分化異常をきたすが、単球系細胞の分化には異常をもたらさないこと、肥満による高レプチン状態では、骨髄細胞においてCCR2発現が亢進し、炎症性変化が生じている可能性があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a state of chronic, low grade inflammation; it is characterized by increased infiltration of a variety of immune cells into obese adipose tissue. In contrast, nutritional deprivation or malnutrition suppresses immune function, thereby conferring higher susceptibility to infectious diseases. In this study, we focused on leptin, a major adipocyte-derived bioactive substance that is produced in response to the nutritional status, and investigated the role of leptin in the regulation of immune function or inflammation. Leptin deficiency caused impairment of B-cell development in the bone marrow, without affecting monocyte development. On the other hand, CCR2 expression in bone marrow cells was upregulated by obesity, suggesting that leptin induces inflammatory changes of bone marrow cells. These observations suggest that leptin may regulate immune cell functions in response to nutritional status.

研究分野：医歯学系

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：レプチン 栄養 飢餓 免疫 炎症

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの基盤病態として全身の軽度の慢性炎症が指摘されており、肥満の脂肪組織自身がマクロファージやTおよびBリンパ球など免疫担当細胞の浸潤に特徴付けられる慢性炎症性の変化を示す。実際、免疫担当細胞の制御により、体重増加とは無関係に糖脂質代謝異常を是正する新しい治療戦略が申請者らを含む複数のグループより提唱されている。一方、飢餓や栄養不良の状態では、体脂肪量の減少とともに、全身の免疫機能が低下し、易感染性を呈することが知られている。しかしながら、生体の栄養状態を感知して免疫応答や炎症反応を制御する分子機構は、未だ十分に理解されていない。

レプチンは代表的なアディポサイトカインであり、体脂肪量に比例して産生され、視床下部の neuropeptide Y (NPY)-NPY Y1 受容体系、 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-メラノコルチン 3 型/4 型受容体 (MC3R/4R) 系を介して摂食抑制やエネルギー消費の亢進に働く。すなわち、レプチンは、末梢の栄養状態を中枢神経系に伝達し、生体の恒常性維持に働く栄養センサーと捉えることができる。一方、レプチン受容体 Ob-Rb は、視床下部以外にも末梢組織に広く分布しており、多彩な生物作用が報告されている。従来、絶食に伴う胸腺の萎縮や末梢血リンパ球の減少にレプチンの関与が報告されているが、最近、申請者らは、絶食により血中レプチン濃度の低下と骨髄 B リンパ球の分化異常を認めること、レプチンを補充することにより B リンパ球の分化異常が回復することを見出した。一方、遺伝的にレプチンを欠損する *ob/ob* マウスは、過食による肥満や高血糖など絶食マウスとは逆の表現型を呈するにも関わらず、絶食と同様の骨髄 B リンパ球分化異常が認められる。レプチン受容体は骨髄 B リンパ球にも発現しているが、少量のレプチンを脳室内に補充することにより、絶食マウスや *ob/ob* マウスで認められる骨髄 B リンパ球分化異常はほぼ完全に回復し、中枢神経系を介するレプチンの作用が示唆された。このような骨髄 B リンパ球分化に関しては、NPY Y1 受容体経路を起点とする視床下部・下垂体・副腎系 (hypothalamus-pituitary-adrenal axis; HPA axis) が主要な役割を果たすが、申請者らは、レプチンが MC3R/4R 経路を介して末梢組織へのマクロファージ浸潤を制御することを報告した。一方、申請者らは、肥満の脂肪組織に浸潤するマクロファージに注目し、脂肪組織炎症の分子機構に関する研究に取り組んできた。特に、骨髄由来の単球が脂肪組織より産生される monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) に誘導されて脂肪組織に浸潤すること、肥満の末梢血単球において既に炎症性サイトカインの発現亢進を示すことを明らかにしてきた。し

かしながら、肥満に伴う高レプチン血症が、免疫担当細胞に及ぼす影響は全く不明である。最近、申請者らは、高脂肪食を負荷した MC4R 欠損マウスが、著明な高レプチン血症と著しい脂肪組織へのマクロファージ浸潤を呈することを見出した。遺伝的にレプチンを欠損する *ob/ob* マウスと比較して MC4R 欠損マウスは、体重や脂肪組織重量が低値にも関わらず、より顕著な脂肪組織炎症を呈し、脂肪組織へのマクロファージ浸潤におけるレプチンの関与が示唆される。

以上のように、生体の栄養センサーであるレプチンは、摂食やエネルギー代謝調節のみならず、免疫応答や炎症反応を制御する可能性が想定され、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、本研究では、生体の栄養センサー・レプチンに注目して、免疫担当細胞が骨髄から末梢血、末梢組織へと移行する過程において栄養状態が及ぼす影響とその分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 絶食による血中レプチン濃度低下と骨髄細胞変化に関する検討

野生型マウスを 48 時間絶食させ、体重、脂肪組織重量、血中レプチン濃度、ならびに骨髄細胞の変化を検討した。血中レプチン濃度は、市販 ELISA キット (R&D 社)、骨髄細胞の変化は、フローサイトメーター (FACSCalibur, BD Biosciences 社) を用いて検討した。

(2) 肥満による血中レプチン濃度上昇と骨髄細胞変化に関する検討

野生型マウスに高脂肪食飼料 (リサーチダイエット社, D12492) を与え、経時的に骨髄細胞を採取して total RNA を調整し、Real-time PCR 法 (StepOnePlus, Applied Biosystems) により mRNA レベルを測定した。

(3) MC4R 欠損と骨髄 B 細胞分化に関する検討

MC4R 欠損マウスの骨髄 B 細胞分化を検討した。また、MC4R KO マウスを 48 時間絶食させ、絶食によるレプチンの効果を検討した。

(4) MC4R 欠損と肥満脂肪組織に関する検討

MC4R 欠損マウスに高脂肪食飼料 (リサーチダイエット社, D12492) を与え肥満を誘導し、脂肪組織内の B 細胞浸潤について、mRNA レベルで検討した。

4. 研究成果

(1) 血中レプチン濃度の低下が骨髄細胞の変化に及ぼす影響に関する検討；

我々は、これまでに、絶食による血中レプチン濃度の低下、ならびに中枢レプチンシグ

ナルの欠失が、骨髄 B 細胞の分化障害をもたらすことを報告している。また、これまでに、栄養飢餓が、胸腺の萎縮や T 細胞の分化障害をもたらすことが知られている。本研究では、絶食に伴う骨髄単球系細胞の変化を検討した。野生型マウスを 48 時間絶食させたところ、体重や脂肪組織重量の減少とともに、血中レプチン濃度は著しく低下した。この時、フローサイトメーターを用いて骨髄細胞分画を検討したところ、CD11b 陽性 Gr1 陰性（単球系）細胞の比率は変化しなかった。

以上より、絶食は、骨髄 B 細胞の分化障害をもたらすが、骨髄単球系には影響を与えないことが示唆された。

(2) 肥満に伴う血中レプチン濃度増加と単球走化性に関する検討；

肥満に伴い脂肪組織に浸潤する炎症促進性マクロファージは、MCP-1/CCR2 系により骨髄より遊走することが報告されているが、末梢血単球の段階で既に炎症性変化を示すことが知られている。本研究では、野生型マウスに高脂肪食を負荷し、骨髄細胞における CCR2 遺伝子の発現を検討したところ、高脂肪食負荷 2 週の早期より、骨髄細胞における CCR2 発現が有意に上昇した。一方、遺伝性肥満 *ob/ob* マウスでは、野生型マウスと比較して、骨髄細胞における CCR2 の遺伝子発現が低下した。

以上より、肥満に伴う高レプチン血症が骨髄細胞の CCR2 発現に影響を及ぼすと考えられた。

(3) MC4R シグナルが B 細胞分化、機能に及ぼす影響

レプチンの摂食調節シグナルに、中枢の MC4R が大きく関与することが知られている。そこで、絶食による血中レプチン濃度の低下やレプチン欠損 *ob/ob* マウスで認められる骨髄 B 細胞分化障害に、MC4R が関与するかどうか、MC4R KO マウスを用いて検討した。定常状態では、MC4R KO マウスの骨髄 B 細胞分化障害は認められず、絶食により野生型マウスと同様に分化障害が認められた。また、その分化障害は、レプチンの投与によって改善した。更に、高脂肪食負荷により認められる脂肪組織 B 細胞の変化は、MC4R KO マウスと野生型マウスで差は認められなかった。

以上より、血中レプチン濃度の低下やレプチン欠損で認められる種々の免疫異常に MC4R が関与する可能性が低いことが考えられた。

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)

Y. Iwasaki, T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M. Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M.

Nakai, Y. Miyamoto, and Y. Ogawa. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes* (査読有) 63:152-161, 2013.

doi: 10.2337/db13-0757

T. Suganami, M. Tanaka, and Y. Ogawa. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocr J.* (査読有) 59: 849-857, 2012.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/endo-crj/59/10/59_EJ12-0271/_article

T. Ehara, Y. Kamei, M. Takahashi, X. Yuan, S. Kanai, E. Tamura, M. Tanaka, T. Yamazaki, S. Miura, O. Ezaki, T. Suganami, M. Okano, and Y. Ogawa. Role of DNA methylation in the regulation of lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver. *Diabetes.* (査読有) 61: 2442-2450, 2012.

<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/61/10/2442.long>

田中 都, 菅波孝祥, 小川佳宏:「肥満症例における脂肪組織の炎症」*SURGERY FRONTIER* (査読無) 20: 31-37, 2013

田中 都, 菅波孝祥, 小川佳宏:「肥満の病態形成における自然炎症の役割」*Annual Review 2013 糖尿病・代謝・内分泌* (査読無): 92-98, 2013

田中 都, 菅波孝祥, 小川佳宏:「脂肪組織炎症とマクロファージ」*感染・炎症・免疫* (査読無) 2012; 41: 14-23

[学会発表](計 6 件)

Miyako Tanaka, et al. Mincle, a novel pathogen sensor in macrophages, underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis in mice. 2014 Keystone Symposia for the meeting on Innate Immunity, Metabolism and Vascular Injury, 2014.3.23-28, Whistler, British Columbia, Canada

田中 都 他, 脂肪組織炎症における病原体センサー・Mincle の意義, 第 34 回日本肥満学会学術大会 2013.10.11-12 東京

池田賢司, 田中 都 他, 肥満の脂肪組織における新規病原体センサー Mincle の役割, 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013.5.16-18 熊本

田中 都 他, 肥満に関連する慢性炎症における新規病原体センサーの病態生理的意義, 第 27 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2013.2.22-23 東京

Miyako Tanaka, et al. Role of Macrophage-inducible C-type Lectin in Obesity-induced Adipose Tissue Inflammation. 2013 Keystone

Symposia for the meeting on Adipose tissue inflammation 2013.1.27-2.1
Keystone, Colorado, USA
田中 都 他,肥満の脂肪組織における新規病原体センサー・Mincle の意義,第
33 回日本肥満学会学術大会
2012.10.11-12 京都

〔図書〕(計 1 件)

田中 都 他,株式会社エル・アイ・シー,
疾患モデルの作製と利用-糖尿病・肥満/
感染症,2012,230

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 都 (TANAKA Miyako)
東京医科歯科大学・大学院医歯(薬)学総
合研究科・メディカルフェロー
研究者番号:60622793

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: