

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670697

研究課題名(和文) エストロゲンのT細胞とマクロファージ制御を介した糖代謝恒常性と妊娠維持機構の解明

研究課題名(英文) Role of estrogen via the recruitment of Treg in the control of glucose homeostasis in female mice.

研究代表者

笹岡 利安 (Toshiyasu, Sasaoka)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：00272906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン(E2)は性周期や妊娠の制御に加えて糖脂質代謝にも関与する。本研究では、E2が制御性T細胞(Treg)を介して慢性炎症を制御することで糖代謝に関わる可能性を検討した。雄性マウスでは、高脂肪食負荷により内臓脂肪組織のTregは減少するのに対し、雌性マウスではTregは増加し、卵巣摘出によりTregの増加は消失した。また、雌性では高脂肪食負荷による慢性炎症が抑制されるのに対し、卵巣摘出により雄性の高脂肪食負荷マウスと同程度の慢性炎症を認めた。以上より、雌性マウスのE2はTregの内臓脂肪組織への局在と機能を高めることで、肥満に伴う代謝障害に対して防御的に作用する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Estrogen is involved in the glucose homeostasis in addition to the regulation of estrous cycle and gestation. In the present study, we examined whether estrogen regulates glucose metabolism by inhibition of chronic inflammation via regulatory T cells (Treg)-mediated alteration of macrophage function. Treg in the vascular adipose tissue was decreased in male mice on high-fat diet (HFD). In contrast, Treg was increased on HFD, and was decreased by ovariectomy in female mice. In addition, the chronic inflammation by HFD was suppressed in female mice, whereas it was apparent in male mice and in female ovariectomized mice on HFD. These results indicate that estrogen protects against obesity-mediated metabolic abnormalities by affecting Treg in the vascular adipose tissue in female mice.

研究分野：糖尿病・内分泌学

キーワード：エストロゲン インスリン抵抗性 糖代謝 免疫 T細胞

1. 研究開始当初の背景

肥満に伴い脂肪組織にはマクロファージが集積する。このことは脂肪組織の免疫状態の変化が代謝に強く影響することを示唆しており、現在もそのメカニズムが精力的に研究されている。特に近年、制御性 T 細胞(Treg)が非肥満の脂肪組織に多く常在し、マクロファージ、T 細胞、NK 細胞などの免疫細胞機能を抑制する機能が注目されている。非肥満時の脂肪組織に局在するリンパ球の約 40% が CD3 陽性 T リンパ球であり、その 75% は CD4 陽性リンパ球に該当する。これらの約半数は Foxp3 を発現する Treg であり、非肥満脂肪組織では豊富に存在する Treg が免疫を抑制すると考えられている(Nat Med 15:930, 2009)。Treg は肥満に伴い脂肪組織で著明に減少することから、肥満に伴う慢性炎症増悪への関与が考えられる。

エストロゲン(E2)は性周期や妊娠の制御に加えて、エネルギー代謝、糖脂質代謝、骨代謝、免疫などの様々な作用に関与する。近年エストロゲンは免疫作用を介して骨代謝や腫瘍免疫に関与することが報告された(JBMR 27:231, 2012)。特に Treg への分化増殖にエストロゲンが関与することが明らかとなり(J Immunol 173: 2227, 2004)、妊娠中の母体での免疫寛容を誘導する機序として注目されている。エストロゲンは Treg を介して Th1/Th2 バランスを制御し、マクロファージの機能にも影響することから慢性炎症の制御により糖代謝に関わる可能性が示唆される。しかし、閉経後の脂肪組織における Treg やマクロファージの極性が糖代謝に及ぼす影響は未知である。

2. 研究の目的

閉経後のエストロゲン欠乏が糖脂質代謝に影響する機序として、従来は末梢臓器への直接作用や中枢性のエネルギー代謝調節の側面から研究が進められてきた。本研究では、エストロゲンの免疫調節を介した視点から新規の代謝制御の機序の解明をめざす。そこで、エストロゲンによる T 細胞とマクロファージの制御が、閉経期の内分泌環境の変化により生じる慢性炎症を介したインスリン抵抗性や耐糖能異常に及ぼす影響を検証する。本研究では、閉経肥満マウス(卵巣摘出+高脂肪食)を偽閉経マウスと共に飼育し、閉経がマウスの脾臓および脂肪組織の T 細胞サブタイプ、マクロファージ極性や慢性炎症に及ぼす影響と代謝障害の関連性を解明する。エストロゲンが Treg を起点とした免疫制御を介して脂肪組織の慢性炎症を制御し、全身の糖代謝の調節に深く関与する可能性を検証し、エストロゲン作用の新たな作用メカニズムを提起することを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肥満閉経モデルマウスの作製

C57BL6/J マウスを使用した。肥満閉経モデルとして、8 週齢の雌性マウスに卵巣摘出術を行い 60% 高脂肪食で 16 週間飼育した高脂肪食負荷閉経群(OVX-HFD)、通常食で飼育した偽手術群(Sham-Chow)、偽手術高脂肪食負荷群(Sham-HFD)の 3 群の雌性マウスと、雄性マウスを通常食(Male-Chow)あるいは高脂肪食(Male-HFD)で飼育した 2 群の雄性マウスを作製した。

マウスは富山大学生命科学先端研究センター・動物実験施設で飼育した。湿度 24 ± 1 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照明は 12 時間サイクル(明期:7-19 時)でコントロールされ、自由摂食、自由飲水下で飼育した。本実験はすべて富山大学動物実験指針に従って実施した。

(2) 肥満閉経モデルマウスの解析

肥満閉経モデルおよび肥満モデルマウスを対照マウスとともに飼育し、卵巣摘出に伴うエストロゲン欠乏の影響を解析した。代謝表現型の解析として、マウスの体重を経時的に測定した。小動物用 MRI を用いて脂肪量の変化、皮下脂肪と内臓脂肪の分布の変化量を調べた。糖代謝の解析は、糖負荷試験とインスリン負荷試験により耐糖能とインスリン感受性を測定した。慢性炎症の解析は、内臓脂肪組織での慢性炎症に関連した F4/80、CD11c、TNF、PPAR γ の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により測定した。脂肪と脾臓組織の免疫学的解析は、フローサイトメトリー(FACS)により Treg 細胞数を測定した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷が雌雄のマウスの体重と脂肪量に与える影響

雄性マウスでは高脂肪食負荷により、対照マウスと比較して顕著な体重増加を認めた。雌性マウスでは高脂肪食負荷により軽度な体重増加を呈したが、卵巣摘出・高脂肪食負荷マウスでは体重増加はより著明であった。

MRI により各マウスの体脂肪分布を測定すると、高脂肪食負荷により内臓・皮下脂肪組織体積は雌雄のいずれにおいても対照マウスと比較して有意に増加した。雌性マウスでは、卵巣摘出・高脂肪食負荷群でより顕著であり、雄性での高脂肪食負荷群と同等の脂肪組織体積の増加を認めた。

(2) 高脂肪食負荷が雌雄のマウスの耐糖能とインスリン感受性に与える影響

雄性マウスでは高脂肪食負荷により耐糖能は顕著に増悪した。雌性マウスでも高脂肪食負荷により耐糖能は悪化した。その程度は卵巣摘出によりさらに増悪して雄性マウスの耐糖能異常と同程度となった。

雄性マウスでは高脂肪食負荷によりインスリン感受性が低下し、顕著なインスリン抵

抗性を認めた。雌性マウスでも、高脂肪食負荷によりインスリン感受性は有意に低下したが、卵巣摘出・高脂肪食負荷群においても、その程度は雄性マウスと比較して軽度であった。

(3)高脂肪食負荷が雌雄のマウスの内臓脂肪組織の遺伝子発現に与える影響

雄性マウスの内臓脂肪組織では、高脂肪食負荷によりマクロファージマーカーの F4/80 と、炎症性 M1 マクロファージマーカーの CD11c、さらに炎症性サイトカインの TNF の顕著な増加を認めた。一方、雌性マウスにおいては、高脂肪食負荷のみでは F4/80、CD11c、TNF の発現増加は認められないが、卵巣摘出した高脂肪食負荷マウスでは、いずれの遺伝子発現も雄性マウスと同等に上昇した。

(4)高脂肪食負荷が雌雄のマウスの内臓脂肪と脾臓組織の T 細胞数に与える影響

CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞を Treg、CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞を Tconv としてフローサイトメトリーにより測定した。雄性マウスの内臓脂肪組織では、高脂肪食負荷により Treg 細胞数の著明な減少が認められた。興味深いことに、雌性マウスの内臓脂肪組織では、高脂肪食負荷により Treg 細胞数は増加した。この Treg 増加は卵巣摘出マウスでは認められず、雄性と同様に低下した。一方で、脾臓組織においては、雌雄のマウスのいずれにおいても Treg 細胞数に変化を認めなかった。

(5)高脂肪食負荷が雌雄のマウスの Treg 細胞の遺伝子発現に与える影響

FACS-Sorting により各マウスの内臓脂肪と脾臓組織に常在する Treg を分取し、Treg の内臓脂肪組織への局在に關与する PPAR γ の遺伝子発現を検討した。

内臓脂肪組織の Treg において、PPAR γ の発現は、雄性マウスでは高脂肪食負荷により低下したが、雌性マウスでは高脂肪食負荷により変化を認めなかった。一方、卵巣摘出・高脂肪食負荷では雄性と同様に低下した。

以上より、雌性マウスではエストロゲンを介して Treg 細胞での PPAR γ の発現を高めて内臓脂肪組織への局在および機能を高めることで慢性炎症を抑制し、肥満に伴う代謝異常に対して防御的に作用する可能性が示された。

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1件)

1. Wada T, Tsuneki H, Sasaoka T. New insights into metabolic regulation via bifunctional function of estrogen α . *Diabetes*. 62: 3996-3998, 2013. 査読有.

[学会発表](計6件)

1. Sameshima A, Wada T, Itoh T, Kashimura A, Yonezawa R, Tsuneki H, Sasaoka T, Saito S. Effects of teneligliptin on glucose and energy metabolism in a mice model of post menopausal obesity. American diabetes Association (ADA) 75th Scientific Sessions, 2015年6月5-9日, Boston, MA, U.S.A.
2. 鮫島 梓, 和田 努, 伊藤哲生, 櫻村彩香, 米澤理可, 恒枝宏史, 笹岡利安, 齋藤 滋. 閉経肥満モデルマウスにおける teneligliptin の糖脂質代謝に対する効果の検討. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015年5月21-24日, 下関.
3. 鮫島 梓, 和田 努, 米澤理可, 恒枝宏史, 笹岡利安, 齋藤 滋. 閉経肥満モデルマウスの脂肪組織における免疫担当細胞の経時的変化と糖代謝異常との関連性について. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2015年4月9-12日, 横浜.
4. 鮫島 梓, 和田 努, 澤川香苗, 森田真裕子, 米澤理可, 恒枝宏史, 笹岡利安. 閉経肥満モデルマウスのエネルギー代謝、うつ、不安に対するエストロゲン投与効果の検討. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年5月22-24日, 大阪.
5. 米澤理可, 和田 努, 森田真裕子, 澤川香苗, 恒枝宏史, 笹岡利安, 齋藤 滋. エストロゲン中枢選択的投与の肥満・耐糖能・うつ改善効果に関する検討. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013年5月16-18日, 熊本.
6. 米澤理可, 和田 努, 鮫島 梓, 笹岡利安, 齋藤 滋. 閉経肥満モデルマウスにおけるエストロゲン末梢または中枢投与のうつ・不安状態に対する改善効果. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2013年5月10-12日, 札幌.

[図書](計1件)

1. 鮫島 梓, 米澤理可, 和田 努, 恒枝宏史, 笹岡利安, 齋藤 滋. 閉経肥満モデルマウスを用いた糖脂質代謝とうつ症状に対するエストロゲンの効果. 産婦人科の実際, 63巻:1006-1008頁, 2014年.

[その他]

ホームページ等

富山大学 大学院医学薬学研究部(薬学系) 病態制御薬理学研究室
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹岡 利安 (SASAOKA, TOSHIYASU)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)
教授
研究者番号：00272906

(2) 研究分担者

恒枝 宏史 (TSUNEKI, HIROSHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)
准教授
研究者番号：20332661

和田 努 (WADA, TSUTOMU)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)
講師
研究者番号：00419334