

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870257

研究課題名(和文)肥満に伴う慢性炎症におけるRP105/MD-1の制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulation mechanisms of RP105/MD-1 in obesity-induced chronic inflammation

研究代表者

渡邊 康春(WATANABE, Yasuharu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・客員助教

研究者番号：80646307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血球系のRP105/MD-1発現細胞が、高脂肪食誘発性の内臓脂肪組織炎症に重要であることがわかった。また、高脂肪食摂餌によりマウス血中の可溶性MD-1が増加することを見出した。内臓脂肪組織あたりの可溶性MD-1の産生量は、高脂肪食摂餌により顕著に増加し、主に内臓脂肪組織の間質細胞から産生されることがわかった。更に可溶性MD-1は、脂肪細胞と相互作用し、マクロファージから産生されることが示唆された。また脂質ライブラリーから、MD-1と相互作用する候補分子を見出した。

研究成果の概要(英文)：The RP105/MD-1 complex expressing cells in hematopoietic cells were involved in high-fat diet-induced adipose tissue inflammation. We found that levels of soluble MD-1 in mice serum were increased by high-fat diet. Soluble MD-1 was dramatically increased by high-fat diet in visceral adipose tissue and produced from stromal vascular cells in the tissue. Soluble MD-1 was increased in co-culture of macrophages and adipocytes, suggesting that macrophages produce soluble MD-1 by the interaction with adipocytes. We identified several candidate lipids from lipid library, which interact with MD-1.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 内臓脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満やメタボリック症候群の進展には、内臓脂肪組織における非感染性の慢性炎症が重要な役割を果たしていると考えられている。内臓脂肪組織には脂肪細胞以外に、炎症反応を抑制する細胞 (Treg や CD4+T 細胞、抗炎症性マクロファージなど) が存在し、脂肪細胞と連携して代謝内分泌系の恒常性を維持している。しかし、肥満に伴い炎症反応を促進する免疫細胞 (炎症性マクロファージ、B 細胞、CD8+T 細胞など) が浸潤し、内臓脂肪組織の炎症反応を増悪化させる。この慢性炎症の惹起・増悪に、病原体を察知する自然免疫センサーが関与することが明らかになってきた。通常、自然免疫センサーが死細胞や組織障害に由来する代謝産物等を内因性リガンドとして認識し、それらに対して炎症反応が惹起されないように防御しているが、この機構が破綻すると自己免疫病などの非感染性慢性炎症が惹起されると考えられる。内臓脂肪組織に炎症が惹起される機序には、肥満に伴う内因性リガンドの量的・質的变化による自然免疫センサーの過度の応答、炎症を正負に制御する細胞群のバランスの変化による炎症制御機構の破綻、の少なくとも 2 つの機序が存在すると考えられる。

研究代表者は、自然免疫センサー Radioprotective 105 (RP105) とその会合分子 MD-1 の KO マウスが、高脂肪食によって誘発される内臓脂肪組織炎症や肥満、インスリン抵抗性が緩和していることを報告した。また、SLE モデルマウスである MRL/lpr-lpr マウスの加齢に伴い、RP105 と会合していない血清可溶性 MD-1 量が増加することがわかっている。以上から、RP105/MD-1 が、非感染性の慢性炎症に深く関与することを示唆する。しかし、RP105/MD-1 の内因性リガンドが未知であることや、その発現細胞も多岐に渡ることから RP105/MD-1 の詳細な機能は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

研究代表者は、高脂肪食摂餌により、マウスの内臓脂肪組織の炎症反応が増悪し、RP105 の発現が普通食の約 13 倍に増加することを見出した。しかし、内臓脂肪組織の主な RP105/MD-1 発現細胞はマクロファージであるが、その他に B 細胞、樹状細胞にもその発現が認められる。更に、非血球系細胞での RP105/MD-1 の発現と機能も明らかになっていない。そこで、RP105/MD-1 の機能細胞を同定し、RP105/MD-1 の発現制御機構を明らかにする。

また、MD-1 は LPS などの疎水性分子と相互作用するポケット構造を有することが報告されている。しかし、パルミチン酸などの TLR4/MD-2 の内因性リガンドが、RP105/MD-1 を介したマクロファージの活性化に関与しないことを見出している。本研究では、RP105/MD-1 の未知の内因性リガンドを探索

し、慢性炎症の発症と増悪化における RP105/MD-1 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画・方法は、以下の 3 つの項目から構成された。

(1) 内臓脂肪組織炎症に関与する RP105/MD-1 発現細胞の同定

RP105 KO マウス、野生型 CD45 のコンジェニックマウスに X 線を照射し、以下の組み合わせで骨髄細胞を移植した。(i) 野生型マウスから野生型マウスへ移植、(ii) 野生型マウスから RP105 KO マウスへ移植、(iii) RP105 KO マウスから野生型マウスへ移植。細胞移植後 4 週間目に骨髄細胞の定着とキメラズムを CD45.1 と CD45.2 抗原や RP105 の発現を指標に、末梢血で確認した。骨髄キメラマウスに、高脂肪食を 12 週間摂餌させ、体重の経時変化を調べた。また、12 週間摂餌後に、フローサイトメトリー法による内臓脂肪組織に浸潤した細胞の割合と細胞数の解析、リアルタイム PCR による内臓脂肪組織炎症の解析をおこなった。

(2) RP105/MD-1 の発現を制御するメカニズムの解明

RAW264.7 細胞と分化した 3T3-L1 細胞を 24 時間共培養後、RNA を抽出した。一方、RAW264.7 細胞と分化した 3T3-L1 細胞を個別に培養し、合わせて RNA を抽出したものをコントロールとし、リアルタイム PCR により炎症性サイトカインと RP105、MD-1 の遺伝子発現を調べた。また、トランスウェルを用いて、両細胞を分離しながら共培養し、それぞれの細胞から RNA を抽出した。

ELISA 法により、下記サンプルの可溶性 MD-1 を定量した。() 野生型マウスに高脂肪食と普通食を摂餌させ、経時的に血清を採取した。() 高脂肪食または普通食摂餌を 12 週間したマウスから、内臓脂肪組織、肝臓、褐色脂肪組織、脾臓、腎臓、骨格筋を採取し、ホモジナイズ後、遠心分離した上清をサンプルとした。() マウスの内臓脂肪組織から間質細胞を調整し、24 時間培養後の培養上清をサンプルとした。() RAW264.7 細胞と分化した 3T3-L1 細胞を 24 時間共培養後、培養上清をサンプルとした。

(3) RP105/MD-1 の内因性リガンドの探索

脂質ライブラリーから脂質をマイクロプレートに固定化した。リコンビナント MD-1 を加えインキュベート後、脂質と相互作用した MD-1 を抗 MD-1 抗体で検出した。

4. 研究成果

(1) 内臓脂肪組織炎症に関与する RP105/MD-1 発現細胞の同定

血球系または非血球系のいずれの RP105/MD-1 発現細胞が、内臓脂肪組織炎症に

関与するのか調べるため、RP105 KO マウスと野生型マウスの骨髄細胞を相互に移植した骨髄キメラマウスを作製した。RP105 欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植したマウスでは、高脂肪摂餌による体重の増加や内臓脂肪組織炎症が軽度であることから、血球系の RP105 発現細胞が内臓脂肪組織炎症に重要な役割を果たすことが示唆された。現在マクロファージ特異的な RP105 欠損マウスを作出し、マクロファージの RP105 が高脂肪誘発性の内臓脂肪組織炎症に関与するのか継続して解析を行っている。

(2)RP105/MD-1 の発現制御機構

脂肪細胞とマクロファージの接触性の相互作用により、RP105/MD-1 の発現が増加することを見出した。

マウス血中の可溶性 MD-1 が高脂肪食摂餌により継続的に増加し、高脂肪食を 12 週間摂餌したマウスでは、普通食の約 2 倍に増加することを見出した。また、可溶性 MD-1 は、高脂肪食摂餌により内臓脂肪組織及び肝臓で増加したが、脾臓、腎臓、骨格筋、褐色脂肪組織では増加しなかった。特に、内臓脂肪組織あたりの可溶性 MD-1 の産生量が、高脂肪食摂餌により普通食の約 10 倍に増加した。内臓脂肪組織の間質細胞の培養上清中に可溶性 MD-1 が産生されることから、高脂肪食摂餌により主に内臓脂肪組織の間質細胞から可溶性 MD-1 が産生されると考えられる。そこで、脂肪細胞に分化誘導し肥大化した 3T3-L1 脂肪細胞と RAW264.7 細胞を共培養すると、可溶性 MD-1 の産生が増加することから、脂肪細胞と相互作用しマクロファージから可溶性 MD-1 が産生されることが示唆された。

(3)RP105/MD-1 の未知の内因性リガンドの探索

プレートに固定化した脂質ライブラリーから、MD-1 と相互作用する候補分子を見出した。今後、MD-1 に特異的に相互作用し、RP105 を介して、シグナルを伝達するのか解析する予定である。

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7件)

Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yamamoto S, Hamashima T, Ishii Y, Tanaka M, Suganami T, Sasahara M, Miyake K, Takatsu K, Isoliquiritigenin Attenuates Adipose Tissue Inflammation in vitro and Adipose Tissue Fibrosis through Inhibition of Innate Immune Responses in Mice, *Sci Rep*, 2016,6,23097, 査読あり, DOI:10.1038/srep23097

Nakamura T, Nishibu A, Yoshida N, Yasoshima M, Anzawa K, Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K, Ogawa K, Mochizuki T. Glycyrrhetic acid inhibits contact hypersensitivity induced by trichophytin via dectin-1. *Exp Dermatol*, 2016, 25(4), 299-304, 査読あり, DOI:10.1111/exd.12931.

Yanagibashi T, Nagai Y, Watanabe Y, Ikutani M, Hirai Y, Takatsu K. Differential requirements of MyD88 and TRIF pathways in TLR4-mediated immune responses in murine B cells *Immunol Lett*. 2015, 163(1), 22-31, 査読あり,

DOI:10.1016/j.imlet.2014.11.012.

Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Okamoto N, Watanabe Y, Tsuneyama K, Hayashi H, Fujii I, Ikutani M, Hirai Y, Muraguchi A, Takatsu K, Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. *J Leukoc Biol*. 2014, 96(6), 1087-100, 査読あり, DOI:10.1189/jlb.3A0114-005RR.

Musumeci MA, Faridmoayer A, Watanabe Y, Feldman MF. Evaluating the role of conserved amino acids in bacterial O-oligosaccharyltransferases by in vivo, in vitro and limited proteolysis assays, *Glycobiology*, 2014, 24(1), 39-50, 査読あり,

DOI:10.1093/glycob/cwt087

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K, Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance, *Nutrients*, 2013,5(9), 3757-78, 査読あり, DOI:10.3390/nu5093757.

Nagai Y, Watanabe Y, Takatsu K. The TLR family protein RP105/MD-1 complex: A new player in obesity and adipose tissue inflammation *Adipocyte*. 2013 Apr 1;2(2):61-6, 査読あり, DOI:10.4161/adip.22929.

[学会発表](計9件)

本田裕恵, 長井良憲, 松永孝之, 岡本直樹, 渡邊康春, 常山幸一, 林宏明, 藤井勲, 平井嘉勝, 高津聖志: 甘草成分イソリクイリチゲニンはNLRP3インフラマソーム活性化を阻害し、2型糖尿病の慢性炎症を改善する, 日本薬学会第136年会, 2016, 3, 29, 横浜

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K.: Accumulation of and increased IL-1 production by neutrophils in adipose tissue: roles of free fatty acid and

leukotriene B4. 第 44 回日本免疫学会
学術集会, 2015, 11, 18, 札幌.

渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志: 遊離
脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症にお
ける好中球の機能解析, 第 36 回日本肥
満学会, 2015, 10, 3, 名古屋.

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志: 遊離
脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症モデ
ルにおける好中球と IL-1 の機能解析,
第 36 回日本炎症・再生医学会, 2015, 7,
21, 東京.

Watanabe Y, Nagai Y, Tsuneyama K,
Takatsu K: Adipocyte-derived free
fatty acids trigger IL-1 production
by neutrophils in mouse adipose tissue,
第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014, 12,
10, 京都

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志: 遊離
脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症にお
ける好中球と IL-1 シグナルの機能解析,
第 35 回日本肥満学会, 2014, 10, 24, 宮
崎.

Watanabe Y, Nagai Y, Tsuneyama K,
Takatsu K: β -adrenergic
receptor-mediated lipolysis of
adipocytes induces accumulation of
large number of neutrophils and
pro-inflammatory responses in mouse
adipose tissue, 第 42 回日本免疫学会
学術集会, 2013, 12, 13, 千葉.

長井良憲, 渡邊康春, 本田裕恵, 戸邊
一之, 高津聖志: メタボリック症候群
における慢性炎症を制御する自然免疫
シグナルの解析, 第 34 回日本肥満学会,
2013, 10, 11, 東京.

Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K:
Regulatory mechanisms of
Radioprotective 105/MD-1 expression
in inflammatory macrophages in the
adipose tissue. 第 78 回日本インター
フェロン・サイトカイン学会, 第 21 回
マクロファージ分子細胞生物学国際シ
ンポジウム 合同学術集会, 2013, 5, 20,
Tokyo.

〔図書〕(計 3 件)

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志: 第 4 章
13 節 RP105. 「series モデル動物利用
マニュアル 疾患モデルの作製と利用
—脂質代謝異常と関連疾患<下巻>」. 尾
池雄一, 佐々木雄彦, 村上誠, 矢作直
也編集, 133-142, 株式会社エルアイシ
ー, 東京, 2015.

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志: 自然
免疫系センサーによる慢性炎症制御と
メタボリック症候群. 別冊 BIO Clinica
慢性炎症と疾患「慢性炎症制御による加
齢関係疾患治療の展望」第 4 巻第 2 号,
67-72, 2015.

Watanabe Y, Naganuma T, Ogawa T,

Muramoto K: Chapter 4, Lectins of
marine origin and their clinical
applications. In: Antitumor
potential and other emerging
medicinal properties of natural
compounds (Ed. by E.F. Fang and T.B.
Ng) Springer, ISBN 978-94-007-6213-8,
2013. DOI 10.1007/978-94-007-6214-5.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 康春 (WATANABE Yasuharu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
客員助教

研究者番号: 80646307