

# 研究報告書

## 「生活習慣病における自然免疫系と代謝内分泌系との機能的クロストークの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 長井 良憲

### 1. 研究のねらい

近年、免疫系は単に病原体の認識・排除や感染症の病態に関わるだけでなく、自己抗原やストレス応答を察知し、それらを排除・修復することにより自己免疫病などの危険な疾患の回避に寄与していると考えられている。したがって免疫系は様々な組織・器官において生体の恒常性維持に関わる重要な生命システムの一つと考えられる。本研究では、生体恒常性維持機構の破綻モデルとして、「生活習慣病における慢性炎症」と「肥満」に着目し、免疫系と代謝内分泌系との機能的なクロストークが代謝内分泌系の恒常性を維持し、その破綻が生活習慣病の発症へと繋がるメカニズムの解明を目指す。

近年、申請者は、①TLR4 類似分子 RP105 とその会合分子 MD-1 が内臓脂肪組織の M1 マクロファージに高発現し、慢性炎症やインスリン抵抗性を制御すること、②脂肪細胞からの遊離脂肪酸産生により、好中球を主体とした内臓脂肪組織炎症が惹起されること、③TLR シグナルアダプター分子 TRIF が中枢神経系において摂食応答を調節し肥満の病態に関わること、を見出した。これらの知見は、TLR などの自然免疫センサーが様々な代謝内分泌器官において機能し、慢性炎症や肥満の発症に関わることを示している。そこで本研究では、1) 内臓脂肪組織における自然免疫センサーのシグナル伝達経路と内因性リガンドの探索、及び遊離脂肪酸による炎症発症機構の解明を目指すと共に、2) 中枢神経系における TRIF の発現を解析し、炎症反応および接触抑制性ホルモンであるレプチンの応答における TRIF シグナルの機能を解明する、の 2 点を主な研究目標として研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

TLR ファミリー分子 RP105/MD-1 が内臓脂肪組織炎症及びインスリン抵抗性を制御するメカニズムを探索するために、RP105/MD-1 の内因性リガンド及びシグナル伝達分子をメタボローム解析及び免疫沈降法で探索した。RP105/MD-1 に結合し、リガンドまたはシグナル伝達分子候補となり得る酸性リン脂質または内臓脂肪組織中の蛋白質を複数見出した。しかし、それらの正確な同定と生理的作用・意義については未解決であり、現在解析を継続している。また RP105/MD-1 が内臓脂肪組織マクロファージにおいて炎症の惹起に関わることを証明するために、マクロファージ特異的 RP105 または MD-1 KO マウスの作製を進めた。flox マウスの樹立に時間を要したが、現在 Lys-M Cre マウスとの掛け合わせを進めており、研究を継続中である。

遊離脂肪酸が自然免疫系を活性化し、内臓脂肪組織炎症を惹起する機序を解明する手掛かりとして、脂肪融解を惹起し多量の脂肪酸を遊離させる  $\beta$  アドレナリン受容体アゴニスト CL316,243 を用いた解析を行った。その結果、脂肪細胞からの脂肪酸遊離により、好中球を

主体とした内臓脂肪組織炎症が惹起され、それに伴い産生される IL-1 $\beta$ が炎症及びインスリン抵抗性の惹起に中心的な役割を果たすことが分かった。また、定常状態の脂肪組織好中球は IL-1 $\beta$ 前駆体の発現が他の細胞に比べて顕著に高く、IL-1 $\beta$ を産生し易い前炎症状態にあることが明らかとなった。この前炎症状態には脂肪細胞との直接的な相互作用及びそれによる NF- $\kappa$ B 活性化が重要であることが示唆された。また、好中球からの IL-1 $\beta$ 産生には NLRP3 以外のインフラマソーム活性化が重要であることが示された。

TLR シグナルアダプター分子 TRIF が視床下部において摂食応答を調節し肥満の発症に関わる機序を解明するために、視床下部における TRIF の発現、視床下部炎症及びレプチン抵抗性の惹起における TRIF の機能について解析した。視床下部において TRIF mRNA の発現を確認したが、蛋白レベルでの検出は困難であった。また、野生型マウスに比較し TRIF KO マウスでは高脂肪食摂餌による視床下部炎症及びレプチン抵抗性が軽減していた。以上から TRIF は視床下部の炎症を惹起し、レプチンシグナルを阻害することで摂食応答を亢進させることが示唆された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「RP105/MD-1 の細胞内シグナル伝達経路の解析」

①これまでの解析から、RP105/MD-1 は主に B 細胞やマクロファージなどの免疫細胞に発現することが明らかとなっている。免疫細胞に発現する RP105/MD-1 が内臓脂肪組織炎症の惹起に関わることを確認するために、骨髓キメラマウスを作製した。RP105 KO マウスを用い、血球系または非血球系において RP105 が欠損するマウスを作製し、高脂肪食を摂餌させた。予想に反して、どちらの骨髓キメラマウスも野生型マウスに比較して、肥満及び内臓脂肪組織炎症が同程度に改善した。以上から、非血球系細胞にも RP105/MD-1 が発現し、内臓脂肪組織炎症の惹起に関わることを示唆された。②内臓脂肪組織において RP105/MD-1 は M1 マクロファージに高く発現している。そこで RP105/MD-1 が内臓脂肪組織マクロファージで機能することを予想し、マクロファージ特異的 RP105 または MD-1 KO マウスの作製に着手した。相同組換え ES 細胞及びキメラマウスの確立に時間を要したが、H28 年度に両マウスの flox マウスを樹立した。現在、Lys-M Cre マウスとの掛け合わせを進めている。③免疫沈降法及びプロテオーム解析を用いて、RP105 と会合する内臓脂肪組織中の蛋白質を探索した。複数の会合分子候補を見出したが、まだ蛋白の同定には至っていない。

### 研究テーマ B「RP105/MD-1 の未知の内因性リガンドの探索」

TLR4/MD-2 がパルミチン酸などの飽和脂肪酸を認識するように、RP105/MD-1 も内因性リガンドとして脂質成分を認識するとの予想のもと、脂質やその代謝物を対象としたメタボローム解析を行った。高脂肪食を摂餌した野生型マウスの血清及び内臓脂肪組織の溶解物を抗 RP105 抗体または抗 MD-1 抗体で免疫沈降し、RP105/MD-1 と結合する脂質などを探索した。酸性リン脂質の結合を検出したが、現在その再現性を確認すると共に、その生理的意義について解析中である。

### 研究テーマ C「遊離脂肪酸が内臓脂肪組織炎症を惹起する機構の解析」

内臓脂肪組織炎症における遊離脂肪酸の機能を解明するために、脂肪融解を惹起し多量の脂肪酸を遊離させる  $\beta$  アドレナリン受容体のアゴニスト CL316,243 を用いた解析を行った。

①CL316,243 の腹腔内投与により、野生型マウスの内臓脂肪組織において多数の好中球浸

潤と TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  MCP-1 などのサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現増加を認めた。特に IL-1 $\beta$  の遺伝子発現は顕著であり、内臓脂肪組織の器官培養により、成熟型 IL-1 $\beta$  の産生を確認した。抗 Gr-1 抗体による好中球の除去により、内臓脂肪組織における IL-1 $\beta$  産生が著減することから、主要な IL-1 $\beta$  産生細胞は好中球であることが示唆された。また好中球の浸潤に遅れてマクロファージが浸潤することも見出した。さらに CL316,243 の投与により、内臓脂肪組織及び肝臓でのインスリンシグナルが阻害され、このシグナル阻害は抗 IL-1 $\beta$  の投与により改善した。以上から、遊離脂肪酸による内臓脂肪組織炎症とそれに伴うインスリン抵抗性の惹起には、好中球の浸潤とそれから産生される IL-1 $\beta$  が重要な役割を果たすことが示唆された。

②成熟型 IL-1 $\beta$  の産生にはインフラマソームの活性化が重要である。CL316,243 投与による IL-1 $\beta$  産生にインフラマソームが関与するか、インフラマソームを構成する ASC, Caspase-1/11, NLRP3 の各 KO マウスを用いて解析を行った。CL316,243 投与による好中球浸潤は、ASC 及び Caspase-1/11 KO マウスで完全に抑制されていたが、NLRP3 KO マウスは野生型と同等であった。以上から、CL316,243 による好中球浸潤は、NLRP3 以外のインフラマソームが関与することが示唆された。

③内臓脂肪組織の好中球が多量の IL-1 $\beta$  を産生する機序を解析するために、内臓脂肪組織より常在性の好中球、マクロファージ及びそれら以外の細胞を単離し、IL-1 $\beta$  の発現をリアルタイム PCR 及び FACS で検討した。その結果、好中球における IL-1 $\beta$  mRNA 及び蛋白レベルでの発現が、他の細胞群に比べて顕著に高かった。また、内臓脂肪組織の好中球は同組織のマクロファージまたは骨髄の好中球に比べて、NF- $\kappa$ B コンポーネントである p65 が核内に高く発現していた。以上から、内臓脂肪組織の好中球は、定常状態で NF- $\kappa$ B の活性化が高く、そのため IL-1 $\beta$  の転写が誘導されることが示唆された。

④内臓脂肪組織の好中球において、NF- $\kappa$ B の活性化及び IL-1 $\beta$  の発現が高い機序を解析するために、3T3-L1 脂肪細胞株と骨髄由来好中球との共培養を行った。共培養後 1 時間で IKK B  $\alpha$  の発現が上昇し、6 時間後に IL-1 $\beta$  の発現が上昇した。これらの発現誘導は、Trans-well を用いた共培養では認められなかった。また、IL-1 $\beta$  の発現誘導は、IKK 阻害剤である BAY11-7082 の添加により、阻害された。以上から、内臓脂肪組織の好中球における IL-1 $\beta$  の発現誘導には、脂肪細胞との直接的な相互作用とそれに伴う NF- $\kappa$ B の活性化が重要であることが示唆された。

#### 研究テーマ D「視床下部における TRIF の発現解析と TRIF 上流の受容体の同定」

野生型マウスより、視床下部を採取し、TRIF の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。視床下部において TRIF mRNA の発現を認めた。他の脳部位(大脳、小脳、海馬など)との比較では、視床下部で特に高い発現を示す傾向はなかった。数種類の抗 TRIF 抗体を購入し、視床下部における TRIF 蛋白の発現をウェスタンブロット法で検討したが、検出は困難であった。陽性対照として用いた脾臓でも検出は困難であったため、用いた抗体がワークしない可能性が示唆された。

#### 研究テーマ E「視床下部のレプチン応答及び炎症状態における TRIF シグナルの解析」

摂食調節及び視床下部炎症における TRIF シグナルの機能を解明するために、野生型マウス及び TRIF KO マウスに高脂肪食を摂餌させ、12 週間後にレプチン応答性及び炎症性遺伝子発現を解析した。野生型マウスでは高脂肪食によりレプチン抵抗性が誘導されるために、レプチン脳室内投与による STAT3 リン酸化及び摂餌量の減少が抑制され、視床下部での

TNF- $\alpha$ の発現が増加していた。一方、TRIF KO マウスでは TNF- $\alpha$ の発現は誘導されず、レプチン感受性は保たれていた。以上から視床下部において TRIF シグナルは視床下部の炎症を惹起し、レプチンシグナルを阻害することが示唆された。

### 3. 今後の展開

本研究では内臓脂肪組織炎症と視床下部炎症がインスリン抵抗性やレプチン抵抗性を誘導する機構における免疫シグナルの重要性を複数の自然免疫センサー・シグナル分子に焦点を当て解析した。今後は自然免疫系が上記炎症を惹起する詳細な機序、主に内因性リガンドの同定とその作用、シグナル伝達経路の解析、免疫細胞と非免疫細胞との相互作用について解析する。高脂肪食摂餌マウスの解析より、RP105/MD-1 は TLR4 よりも 2 型糖尿病、肥満の発症に深く関与することは明らかである。候補の内因性リガンド、シグナル伝達分子を同定し、それらの生理作用を明らかにする。またコンディショナル KO マウスの解析により、RP105/MD-1 が機能し炎症惹起に重要な細胞を同定する。以上から 2 型糖尿病、肥満の発症における RP105/MD-1 の全体像を明らかにする。

今回、これまでに報告のない、内臓脂肪組織に常在する好中球のユニークな特徴を見出した。好中球の前炎症状態が誘導されるには、脂肪細胞との接触性相互作用が重要であることが示されている。相互作用による好中球の変化をマイクロアレイや RNA seq を用いて網羅的に解析し、前炎症状態となる機序を解明する。

今回見出した TRIF シグナルは視床下部炎症の惹起に関わる新しいシグナル経路と考えられる。KO マウスの解析から、TRIF シグナルがレプチン抵抗性を誘導するのは明らかであり、今後は TRIF シグナルの誘導に関わる内因性リガンドとその産生機序、TRIF 発現細胞の同定を進める。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、免疫系、特に原始的な免疫系である自然免疫系と代謝内分泌系、特に内臓脂肪組織と視床下部とのクロストークが慢性炎症を誘導する機構について解析を進めた。研究者が独自に見出した RP105/MD-1 の内臓脂肪組織炎症の誘導機構については、内因性リガンドの同定には至っておらず、コンディショナル KO マウスの作製にも遅延が生じた。本来の期待した成果を出すことは出来なかったが、今後も研究を継続し、RP105/MD-1 の機能解明に取り組みたい。一方、内臓脂肪組織に常在する好中球のユニークな機能を発見し、IL-1 $\beta$ を介する内臓脂肪組織炎症に、好中球が中心的な役割を果たすことを見出した。これは、これまでに報告のない興味深い成果と考えており、現在論文執筆中である。摂食調節における TRIF シグナルの解析については、内因性リガンド候補として stathmin を見出し、TRIF シグナルを介して視床下部炎症・レプチン抵抗性を誘導するという機序の解明に繋がる成果が出ている。今後、詳細な解析を行い、H29 年度中に論文を投稿する予定である。また、自然免疫センサーの活性化を阻害し、内臓脂肪組織炎症・線維化を抑制する甘草由来の天然物 isoliquiritigenin を見出しており、原薬製造メーカーと共同で本薬物を多く含む甘草エキスの抽出に取り組んでいる。今後、抽出エキスの抗炎症作用を解析し、産学連携による機能性食品の開発に取り組む



と共に、本薬物が今回見出した内臓脂肪組織炎症・視床下部炎症の機構を抑制するかどうかについても解析を行いたい。

研究実施体制については、実験の補助に必要な補佐員を雇用し、研究の進捗に大いに役立った。また研究費については、フリーザーが故障したため新規に購入した以外は、ほぼ計画通りに執行した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、「生活習慣病における慢性炎症」と「肥満」に着目し、免疫系と代謝内分泌系との機能的なクロストークが生体の恒常性を維持し、その破綻が生活習慣病の発症へと繋がるメカニズムの解明を目指した。その結果、TLRファミリー分子 RP105/MD-1 のリガンド候補分子や TRIF シグナルの内因性リガンドを複数発見するとともに、内臓脂肪炎症での好中球の役割を見出しており、詳細な解析の後に論文化する予定である。また、内臓脂肪炎症を抑制する天然物について企業との共同研究も進んでいる。論文発表などの外部発表や特許出願も多く、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. 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* 96(6), 1087–1100, 2014
2. 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* 163(1), 22–31, 2015
3. 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* 25, 299–304, 2016
4. 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* 6, 23097; doi:10.1038/srep23097, 2016
5. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Arif A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1  $\alpha$  in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. *Diabetes* 65(12), 3649–3659, 2016

## (2)特許出願

研究期間累積件数:5 件

1.

発 明 者: 藤本ゆかり、深瀬浩一、高津聖志、長井良憲、岡本直樹

発明の名称: トール様受容体 4 活性化作用を有するフニコロシン誘導体及びその用途

出 願 人: 富山大学、大阪大学、テイカ製薬株式会社

出 願 日: 2014/9/30

出 願 番 号: 特願 2014-201593

## (2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 主要な学会発表

1. 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、東京、2013 年 10 月 11 日
2. 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 $\beta$ シグナルの機能解析 第 35 回日本肥満学会、宮崎、2014 年 10 月 24 日
3. 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 $\beta$ の機能解析 第 36 回日本炎症・再生医学会、東京、2015 年 7 月 21 日
4. 長井良憲 メタボリック症候群と慢性炎症: 炎症を改善する天然薬物の探索 とやま市民公開講座「慢性炎症疾患の発症・進行と制御」、富山、2015 年 10 月 3 日(招待講演)
5. 長井良憲 自然免疫を標的とした慢性炎症治療薬の創薬研究 第 62 回薬事研究会総会特別講演、富山、2016 年 5 月 23 日(招待講演)
6. 長井良憲 自然免疫の光と影～慢性炎症における自然免疫異常と天然薬物による制御～ 第 9 回高サイトカイン血症研究会講演会、東京、2016 年 11 月 5 日(招待講演)

### 受賞

1. 長井良憲 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 $\beta$ の機能解析 第 36 回日本炎症・再生医学会優秀演題賞 2015 年 7 月 22 日

### 著作物

1. 長井良憲、渡邊康春、高津聖志 自然免疫系受容体 RP105/MD-1 によるメタボリック症候群の制御 内分泌・糖尿病・代謝内科 37(6): 610-616, 2013
2. Nagai Y and Takatsu K. Section2. Part E. 26. Role of the immune system in obesity-associated inflammation and insulin resistance. In “Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity” (Ronald R. Watson), pp281-293, ELSEVIER/Academic Press, New York, 2014
3. 本田裕恵、長井良憲、高津聖志 第 6 章 3 植物由来成分による TLR4/MD-2 シグナルの抑制 エンドトキシン・自然免疫研究 17 谷徹、横地高志編集 80-85, 医学図書出版

株式会社, 東京, 2014

4. 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
5. 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代謝リック症候群 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
6. 長井良憲、高津聖志 自然免疫センサーによる炎症性マクロファージの制御と天然薬物による炎症制御 週刊医学のあゆみ 第1土曜特集「代謝調節における免疫細胞の役割」 Vol.257, No.6, 613-619, 2016
7. Nagai Y, Honda H, Watanabe Y, Takatsu K. Chapter 30 Potential therapeutic natural products for the treatment of obesity-associated inflammation by targeting TLRs and inflammasomes. In “Chronic Inflammation – Mechanisms and Regulation –“ (M. Miyasaka and K. Takatsu), pp379-397, Springer Japan, Tokyo, 2016
8. Nagai Y, Watanabe Y, Honda H, Takatsu K. Isoliquiritigenin: A unique licorice component that attenuates adipose tissue inflammation and fibrosis by targeting the innate immune sensors. In “Research of licorice in the past, present and future – Preparation of various bioactive extracts as alternative medicines” (H. Sakagami), IN TECH, in press

## プレスリリース

1. 「生薬甘草の成分が内臓脂肪の炎症・線維化を抑制する機序を解明」 富山大学と JST とで共同リリース 2016 年 3 月 14 日