

学位論文

ステロイドホルモンによる免疫細胞を介した  
内臓脂肪組織における肥満関連慢性炎症制御機構の解明

富山大学大学院医学薬学教育部  
博士後期課程 薬科学専攻  
病態制御薬理学

石川 明香里

## 目次

論文要旨 .....	5
第1章 本研究の背景と目的.....	9
第1節 肥満と糖尿病 .....	9
第2節 ステロイドホルモンと糖尿病 .....	9
第3節 レニン-アンジオテンシン-アルドステロンシステム (RAAS).....	10
第4節 脂肪組織マクロファージと鉍質コルチコイド受容体 .....	10
第5節 NLRP3 インフラマソーム .....	11
第6節 女性ホルモンによる糖代謝制御 .....	12
第7節 制御性 T 細胞と慢性炎症.....	13
第8節 本研究の目的 .....	13
第2章 鉍質コルチコイド受容体阻害剤によるマクロファージを介した 糖代謝改善機構の解明 .....	15
第1節 目的.....	15
第2節 実験方法 .....	15
第1項 実験動物 .....	15
第2項 糖・インスリン負荷試験 .....	16
第3項 核磁気共鳴画像法による体組成の解析.....	16
第4項 小動物用代謝計測システムによるエネルギー代謝の計測.....	16
第5項 血圧測定 .....	16
第6項 深部体温測定 .....	16
第7項 組織化学的解析.....	17
第8項 フローサイトメトリーによる細胞分析.....	17
第9項 Real-time PCR.....	18
第10項 Western blotting.....	18
第11項 ELISA による免疫学的解析 .....	19
第12項 骨髄由来マクロファージの培養 .....	19
第13項 蛍光強度測定による細胞内活性酸素種の定量.....	20
第14項 統計解析 .....	20
第3節 結果.....	21
第1項 エプレレノンがマウスの体組成および糖代謝に与える影響 .....	21

第 2 項	エプレレノンが血圧、組織重量および血清パラメーターに与える影響.....	23
第 3 項	エプレレノンがマウスのエネルギー代謝に与える影響 .....	25
第 4 項	エプレレノンがマウスの内臓脂肪組織および肝臓の組織学的変化に与える影響.....	27
第 5 項	エプレレノンが脂肪組織マクロファージの極性と鉍質コルチコイド受容体発現に与える影響 .....	29
第 6 項	エプレレノンが内臓脂肪組織および肝臓の慢性炎症に与える影響 .....	31
第 7 項	鉍質コルチコイド受容体の障害が骨髄由来マクロファージの炎症性サイトカイン発現および活性酸素産生に与える影響 .....	33
第 8 項	エプレレノンが内臓脂肪組織および肝臓における NLRP3 インフラマソーム活性に与える影響.....	35
第 4 節	考察.....	37
第 5 節	小括.....	39
第 3 章	内臓脂肪組織における肥満に伴う制御性 T 細胞局在変化の雌雄差とその機序の解明.....	41
第 1 節	目的.....	41
第 2 節	実験方法 .....	41
第 1 項	実験動物 .....	41
第 2 項	エストロゲン補充 .....	42
第 3 項	糖・インスリン負荷試験 .....	42
第 4 項	核磁気共鳴画像法による対組成の解析.....	42
第 5 項	小動物用代謝計測システムによるエネルギー代謝の計測.....	42
第 6 項	フローサイトメトリーによる細胞分析.....	42
第 7 項	Real-time PCR.....	43
第 8 項	統計解析.....	43
第 3 節	結果.....	45
第 1 項	食餌性肥満マウスの体重増加およびエネルギー代謝における雌雄差とエストロゲンの影響 .....	45
第 2 項	食餌性肥満マウスの糖代謝における雌雄差とエストロゲンの影響 .....	47
第 3 項	食餌性肥満マウスの VAT-Treg 局在の雌雄差とエストロゲンの影響 .....	49
第 4 項	食餌性肥満マウスの脂肪組織慢性炎症における雌雄差と	

エストロゲンの影響 .....	51
第 5 項 食餌性肥満マウスの脂肪組織 Treg における IL33/ST2 シグナル .....	52
第 6 項 脂肪組織のケモカイン発現および脂肪組織 Treg のケモカイン受容体 発現における雌雄差とエストロゲンの影響.....	53
第 7 項 脾臓 Treg のケモカイン受容体発現における雌雄差と エストロゲンの影響.....	55
第 4 節 考察.....	56
第 5 節 小括.....	59
第 5 章 総括.....	60
参考文献 .....	61

## 論文要旨

### 序論

本邦では、生活習慣や社会環境の変化により糖尿病人口が増加し、平成 28 年の調査では約 1,000 万人が糖尿病と推計されている。糖代謝の調節にはインスリンを含む様々なホルモンが関与する。ステロイドホルモンのひとつであるアルドステロンは、鉍質コルチコイド受容体 (MR) を介してインスリン抵抗性を誘導することが知られている。当研究室ではこれまで、MR 阻害薬エプレレノン (Ep) が肥満マウスの糖代謝を改善することを報告してきた。一方、2 型糖尿病の基盤病態であるインスリン抵抗性の進展には、脂肪組織の慢性炎症が深く関わる。したがって、本研究でははじめに、慢性炎症に寄与する主要細胞であるマクロファージ (M $\phi$ ) の MR に着目し、Ep による糖代謝改善機構を検討した。一方、慢性炎症を抑制し、糖代謝恒常性の維持を担う免疫細胞として、制御性 T 細胞 (Treg) の重要性が示されている。女性ホルモンであるエストロゲンは、インスリン標的組織に作用して糖代謝を亢進するほか、Treg の分化を促進することが報告されている。女性では閉経に伴い肥満者および糖尿病患者数が増加するが、閉経に伴う糖代謝異常におけるエストロゲンの脂肪組織 Treg への関与は不明である。そこで次に、閉経肥満マウスを作製し、さらに生理的なエストロゲン補充モデルを確立し、脂肪組織 Treg を介したエストロゲンの抗糖尿病作用を検討した。本研究により、これらステロイドホルモンと免疫細胞の観点から脂肪組織の慢性炎症制御機構を解明することで、糖尿病の新たな治療戦略を探求した。

### 鉍質コルチコイド受容体阻害剤によるマクロファージを介した糖代謝改善機構の解明<sup>1</sup>

12 週間の高脂肪食 (HFD) 負荷による食餌性肥満マウスを作製し、Ep 投与による代謝改善効果およびその機序として M $\phi$  に与える影響を検討した。

Ep 投与は食餌性肥満マウスの糖代謝異常および脂肪組織慢性炎症の増悪を著明に改善した。フローサイトメトリーにより内臓脂肪組織 (eWAT) における M $\phi$  極性を解析したところ、Ep 投与は HFD 負荷による炎症性 M1-M $\phi$  (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> CD206<sup>-</sup>細胞) の増加と抗炎症性 M2-M $\phi$  (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup>細胞) の減少を改善した。M $\phi$  極性と MR 発現の関連を明らかにするため各極性 M $\phi$  における MR mRNA 発現を検討した結果、脂肪組織 M1-M $\phi$  では M2-M $\phi$  と比較し MR 発現が低いこと、および骨髓由来 M $\phi$  (BMDM) を用いた *in vitro* 検討で、Ep 処置が M1, M2-M $\phi$  いずれにおいても MR 発現を変化させないことが明らかとなった。その一方で Ep 投与は、肥満に伴い

主に M1-M $\phi$  により産生され、インスリン抵抗性の進展に深く関与する IL1 $\beta$ の産生を抑制した。IL1 $\beta$ 産生には、NLRP3 インフラマソームが重要な役割を担う。そこで次に、Ep による M $\phi$  を介した抗炎症機構として、インフラマソームに与える影響を検討した。インフラマソームの活性化には IL1 $\beta$ の前駆体 proIL1bおよびインフラマソーム構成要素の転写を促進するプライミング (Signal 1) と、IL1 $\beta$ の成熟化を促進するトリガリング (Signal 2) の 2 つの刺激が必要となる。マウスの脂肪組織および肝臓において、Signal 1 活性化の指標として NF $\kappa$ B のリン酸化および proIL1bとインフラマソーム構成要素の遺伝子発現を検討したところ、HFD 負荷によるこれらの増加は Ep 投与により有意に抑制された。in vivo の結果に一致して、BMDM において siRNA を用いて MR をノックダウンした際にも LPS (Signal 1) 誘導性の proIL1b 発現が抑制された。また、Signal 2 活性化の指標として pro-caspase 1 の自己切断による Caspase 1 の産生とこれに伴う IL1 $\beta$ の産生を検討したところ、脂肪組織と肝臓のいずれにおいても Ep 投与による抑制を認めた。さらに、BMDM に対し、LPS によるインフラマソームのプライミング刺激を行った後に Ep を処置し、ATP または Nigericine によるトリガリング刺激を行った際にも IL1 $\beta$ 発現は低下した。したがって、Ep は NLRP3 インフラマソーム活性化に必要な Signal 1, 2 の両機構を抑制することが示され、その抑制機序として Ep は BMDM における活性酸素種の産生を抑制することを見出した。また、Ep 投与は HFD 負荷マウスの酸素消費量、自発運動量および直腸温の低下を抑制し、褐色脂肪組織の熱産生遺伝子発現を亢進させた。したがって、Ep による肥満抑制機構として、M $\phi$  のインフラマソーム活性抑制に加え、基礎代謝亢進の寄与が示唆された。

本研究により、肥満病態の代謝異常に対する MR 阻害剤の有益な作用が明らかとなった。その機序として、エプレレノンが体内の肥満環境により誘導される NLRP3 インフラマソームの活性化を直接阻害することを提示した。以上より、肥満や 2 型糖尿病をはじめとするインフラマソーム関連疾患に対し、MR が新たな治療戦略の標的となる可能性を見出した。

## 内臓脂肪組織における肥満に伴う制御性 T 細胞局在変化の雌雄差とその機序の解明<sup>2</sup>

Treg は、脂肪組織の慢性炎症を抑制し、全身の糖代謝恒常性維持に重要な役割を担う。肥満病態において、雄性では脂肪組織に常在する Treg (VAT-Treg) が減少し、慢性炎症の増悪に深く関与する。一方、雌性では肥満による VAT-Treg の変化は不明であった。肥満病態における糖代謝悪化の程度には性差があることから、肥満に伴う VAT-Treg 局在の雌雄差とその機序を検討した。

雄性マウスでは 16 週間の HFD 負荷 (M-HFD 群) により、著明な脂肪蓄積と糖・エネルギー代謝および脂肪組織慢性炎症の悪化を示した。雌性マウスでは HFD 負荷 (F-HFD 群) によるこれらの代謝異常は軽度であったが、HFD 負荷に加え卵巣摘出 (OVX) を行った閉経肥満マウス (OVX-HFD 群) では、代謝異常の顕著な増悪を認めた。一方、生理的条件のエストロゲン補充は (OVX-HFD+E2 群)、本代謝異常を F-HFD マウスと同程度まで改善させた。その際、全身性の免疫細胞割合を反映する脾臓においては、Treg (CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞) の割合は雌雄とも各群で変化を認めなかった。一方、VAT-Treg の割合は、雄性では既報と一致し HFD 負荷により減少した。これに対し、雌性の VAT-Treg は HFD 負荷により増加傾向を認めたが、OVX-HFD 群では変化を認めなかった。さらに、OVX-HFD+E2 群では F-HFD 群と同程度の VAT-Treg の増加を認めた。したがって、肥満による VAT-Treg 局在変化には雌雄差があり、エストロゲン作用の関与が示唆される。Treg の組織局在化にはケモカインシグナルの関与が知られていることから、肥満に伴う VAT-Treg 局在の雌雄差の機序として、ケモカインシグナルに着目した。網羅的なケモカインおよび受容体発現のスクリーニング解析により、雌性の内臓脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞におけるケモカイン受容体 CCR6 および CXCR3 発現と、内臓脂肪組織におけるケモカイン CCL24 発現が、雌性 VAT-Treg 局在変化と一致した変化を示すことが明らかとなった。これらの遺伝子発現の変化は脾臓では認められず、脂肪組織特異的であると考えられた。したがって、エストロゲンを介した雌性 VAT-Treg の遊走に、CCR3/CCL24、CCR6/CCL20 および CXCR3/CXCL10 シグナルが関与する可能性を見出した。

以上より、肥満病態での脂肪組織恒常性維持に重要な VAT-Treg 局在に性差があることを見出し、その性差にはエストロゲンが深く関与することを明らかにした。さらに、雌性における食餌性肥満に伴う VAT-Treg の増加は、エストロゲンを介したケモカインシグナルにより誘導されることが示唆された。本知見は雌性マウスにおける肥満に伴う糖代謝異常に対する防御機構として、重要な役割を担う可能性が考えられる。

## 結論

本研究では、インスリン抵抗性の進展に深く関与する、脂肪組織の慢性炎症促進機構としてマクロファージに対するアルドステロンの関与、および慢性炎症抑制機構として Treg に対するエストロゲンの関与を解明した。MR 阻害薬であるエプレレノン<sup>®</sup>は、現在本邦において高血圧症および慢性心不全に適応があり、近年さらに選択性の高い抗 MR 薬が臨床利用可能となっている。糖尿病患者では高血圧症の合併が多いことから、本病態においてより高い治療効果が期待される。また、女性では閉経後に肥満および糖

尿病の発症が増加することから、更年期の代謝障害にエストロゲンの関与が強く示唆されている。長寿命社会である現在、エストロゲンによる VAT-Treg を介した脂肪組織慢性炎症制御機構に関する新規本知見は、閉経期の肥満病態の解明に重要と考えられる。

免疫細胞やその関連シグナルを標的とした治療法は、自己免疫疾患、癌、ウイルス性疾患など多くの分野において注目されているが、2型糖尿病領域において免疫系を標的とした治療法は確立されていない。糖尿病の増加に伴いより効果的な治療法が求められることから、本知見が新たな治療戦略につながることを期待される。

## 参考文献

- 1) Tsutomu Wada, Akari Ishikawa, Eri Watanabe, Yuto Nakamura, Yusuke Aruga, Hayate Hasegawa, Yasuhiro Onogi, Hiroe Honda, Yoshinori Nagai, Kiyoshi Takatsu, Yoko Ishii, Masakiyo Sasahara, Daisuke Koya, Hiroshi Tsuneki and Toshiyasu Sasaoka. Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J Endocrinol.* 235: 179-191, 2017
- 2) Akari Ishikawa, Tsutomu Wada, Sanshiro Nishimura, Tetsuo Ito, Akira Okekawa, Yasuhiro Onogi, Eri Watanabe, Azusa Sameshima, Tomoko Tanaka, Hiroshi Tsuneki, Shigeru Saito, Toshiyasu Sasaoka. Estrogen regulates sex-specific localization of regulatory T cells in adipose tissue of obese female mice. *PLoS ONE* 15: e0230885, 2020



## 第 1 章 本研究の背景と目的

### 第 1 節 肥満と糖尿病

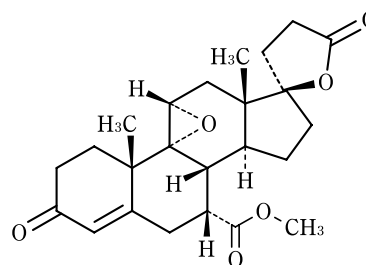
平成 28 年の厚生労働省「国民健康・栄養調査」において、糖尿病が強く疑われる者が約 1 千万人と推計された。この推計人数は年々増加しており、社会問題となっている。この背景には、食の欧米化による生活習慣の変化や、社会環境の変遷に伴う運動不足およびストレスの増加が深く関与すると考えられている。糖尿病は腎症、網膜症および神経障害を三大主徴とする合併症を誘発するほか、脳梗塞や冠動脈疾患などの心血管疾患リスクを上昇させる。これら合併症の発症を予防するため、糖尿病の治療にはインスリン製剤に加え様々な機序の血糖降下薬が使用されている。しかし、糖尿病人口が増加の一途をたどっている現状を鑑みると、これらの治療効果が十分であるとは言えず、早急な対策が求められる。

### 第 2 節 ステロイドホルモンと糖尿病

生体内の代謝恒常性は、様々なホルモンにより維持されている。糖代謝を調節する主要なホルモンであるインスリンは、直接的に血糖値を降下させる唯一のホルモンである。一方、血糖値の上昇に寄与するホルモンは複数存在し、中でもステロイドホルモンの関与が注目されている。ステロイドホルモンは、コルチゾールを代表とする糖質コルチコイド、アルドステロンを代表とする鉱質コルチコイド、およびエストロゲン・アンドロゲンといった性ホルモンに大別される。実際に、糖代謝異常はコルチゾールが過剰産生されるクッシング症候群の主症候のひとつであり、患者の半数以上に耐糖能障害を認める (Mazziotti et al., 2011)。一方、アルドステロンが過剰産生される原発性アルドステロン症患者の 15~25%においても耐糖能障害が認められている (Corry et al., 2003)。また、男女ともに加齢に伴う耐糖能の低下には、性ホルモンの減少が関与する (Menendez et al., 2011; Margolis et al., 2004)。したがって、ステロイドホルモンと 2 型糖尿病は密接に関連すると考えられるが、その詳細な機構には不明な点が多い。

### 第 3 節 レニン-アンジオテンシン-アルドステロンシステム (RAAS)

RAAS は、体内の水分・電解質バランスおよび血圧を調節するホルモンカスケードである (Giacchetti et al., 2005)。肥満によりこのカスケードが過剰に活性化され、主にアンジオテンシン II の作用を介してインスリン抵抗性が進展する (Olivares-Reyes et al., 2009)。一方で、アンジオテンシン II とは独立して、アルドステロンの受容体である鉱質コルチコイド受容体 (Mineralocorticoid Receptor; MR) の活性化が肥満関連インスリン抵抗性の進展に寄与することが明らかとなってきた。当研究室では、MR 拮抗薬であるエプレレノンが、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスにおける肥満関連の代謝異常、慢性炎症および脂肪肝を抑制することを報告した (Wada et al., 2013)。エプレレノンはアルドステロンと同様にステロイド骨格を有し (下図)、MR を競合阻害する。本薬剤は、本邦において現在高血圧症および慢性心不全に適応があり、セララ® (Pfizer) の商品名で臨床利用されている。しかし、エプレレノンが肥満マウスの糖代謝および慢性炎症を改善させる詳細なメカニズムは未だ不明である。



### 第 4 節 脂肪組織マクロファージと鉱質コルチコイド受容体

自然免疫系は非特異的な生体内防御機構であるが、病原体などの外来性抗原だけでなく、組織傷害に伴い放出される内因性抗原に対してもその作用を担う。特に、肥満病態下で自然免疫系が賦活化されることでインスリン抵抗性が誘導されるが、この作用にマクロファージが重要な役割を担うと考えられている (Lackey et al., 2016)。マクロファージは、炎症性の M1 と抗炎症性の M2 の、少なくとも 2 つの極性を示す (Fujisaka et al., 2009)。通常の内臓脂肪組織常在マクロファージの大部分は M2 極性を示すが、肥満病態の脂肪組織では M1 マクロファージが浸潤し、脂肪組織慢性炎症が進展する。興味深いことに、骨髄細胞特異的 MR 欠損マウスのマクロファージは M2 様の転写プロファイルを示すことが報告された (Usher et al., 2010)。しかし、M1 または M2 脂肪組織マクロファージ (ATM) における MR 発現や、MR の阻害がマクロファージの機能におよぼす影響は不明である。

## 第5節 NLRP3 インフラマソーム

肥満関連インスリン抵抗性の進展には IL1 $\beta$  が深く関与し、IL1 $\beta$  の産生には Nod-like receptor, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) インフラマソームが重要な役割を担う (Maedler et al., 2002; Stienstra et al., 2010; Stienstra et al., 2011; Vandanmagsar et al., 2011; Latz et al., 2013; Coll et al., 2015; Lackey et al., 2016)。NLRP3 インフラマソームの活性化は、2段階のシグナルにより誘導される。まず、プライミング刺激として、病原体関連分子パターン (PAMP) が主にマクロファージなどの免疫細胞表面に存在する Toll-like receptor 4 (TLR4) などのパターン認識受容体により認識されると、下流の NF $\kappa$ B が活性化され、proIL1b およびインフラマソーム構成分子の遺伝子発現が誘導される (Signal 1)。次に、トリガリング刺激として、免疫細胞が活性酸素種 (ROS)、ATP による K<sup>+</sup> の細胞外流出、および尿酸などの結晶類といった損傷関連分子パターン (DAMP) を認識することで、NLRP3、apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) および pro-caspase1 が複合体を形成し、NLRP3 インフラマソームが構築される (Signal 2)。引き続き pro-caspase1 の自己切断活性化により Caspase 1 が産生され、Signal 1 により転写促進された proIL1b が切断されて IL1 $\beta$  が産生される (Figure 1)。NLRP3 インフラマソームは肥満病態で活性化することから、

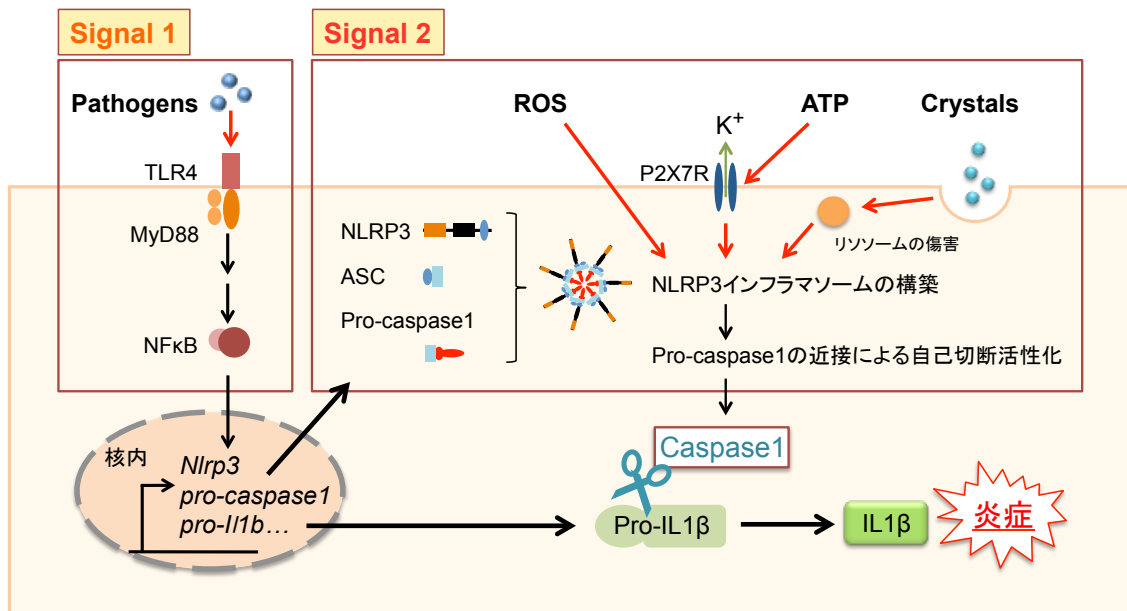
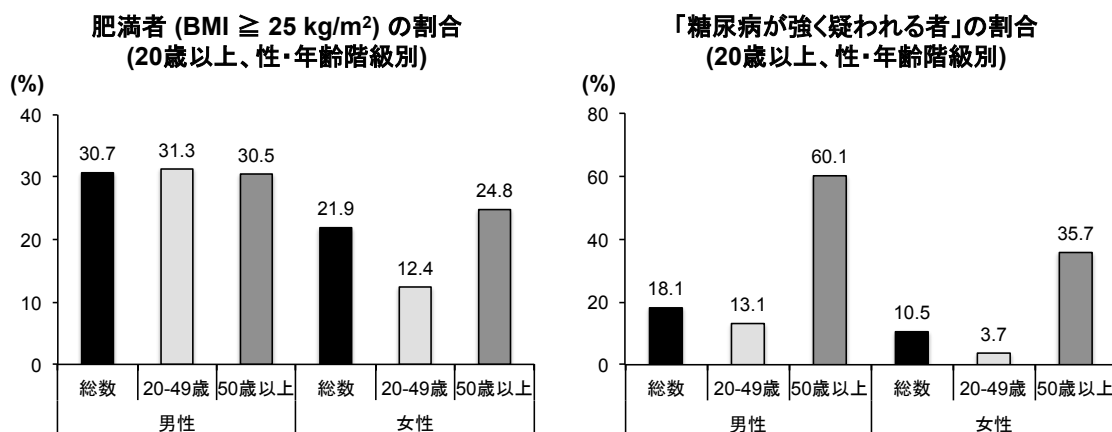


Figure 1 マクロファージにおける NLRP3 インフラマソーム活性化機構

本病態に関連する代謝異常の治療標的と考えられる。実際に、インフラマソーム構成成分である NLRP3、Caspase 1、ASC または IL1 $\beta$  を遺伝的に欠損させたマウスでは、食餌性肥満による糖代謝の悪化が改善する (Stienstra et al., 2010; Stienstra et al., 2011)。しかし、インフラマソームと RAAS の病態生理学的関連は検討されていない。

## 第 6 節 女性ホルモンによる糖代謝制御

糖尿病患者およびその一因となる肥満者の年齢階級別割合には、男女差が存在する (Figure 2)。男性では肥満者の割合に年齢差を認めないのに対し、女性は閉経を迎える 50 代以降で肥満者の割合が 2 倍に増加する。また、糖尿病が強く疑われる者の割合は、男性では 50 歳を越えると約 4.6 倍に増加するが、女性では約 9.7 倍と高まることから、女性は加齢による糖尿病の罹患リスクがより高いと考えられる。これらには閉経に伴う女性ホルモンの低下が影響すると考えられている。当研究室では、女性ホルモンのエストロゲンが閉経肥満モデルマウスにおける脂肪組織の慢性炎症および肝臓の糖新生を抑制し、エネルギー代謝を亢進させることで肥満および糖代謝を改善することを報告した (Yonezawa et al., 2012)。一方、雄性ではエストロゲンによる防御機構がないため、過栄養に対し代謝異常を来たしやすいと考えられている (Palmer et al., 2015)。また、エストロゲンは免疫調節においても重要な役割を担うことが知られており (Klein et al., 2016)、エストロゲンによる免疫調節を介した代謝改善作用の可能性が考えられる。



厚生労働省 平成29年「国民健康・栄養調査」より作図

**Figure 2** 肥満者 (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>) および「糖尿病が強く疑われる者」の割合 (20歳以上、性・年齢階級別)

## 第 7 節 制御性 T 細胞と慢性炎症

制御性 T 細胞 (Treg) は自己免疫反応などの過剰な免疫反応を抑制する (Chaudhry et al., 2013)。妊娠期におけるエストロゲン濃度の上昇は、ナイーブ T 細胞から Treg への分化を促進し、母体-胎児間の免疫寛容の形成に寄与する (Polanczyk et al., 2005)。一方、雄性肥満マウスでは内臓脂肪組織に局在する Treg (VAT-Treg) が減少することで、慢性炎症の悪化が助長される (Feuerer et al., 2009; Winer et al., 2009)。実際に、Treg を欠如させたマウスでは脂肪組織慢性炎症が悪化することや、Treg を移植した肥満マウスでは糖代謝が改善することが報告されている (Feuerer et al., 2009; Eller et al., 2011)。したがって、雄性において Treg は肥満病態における体内の恒常性破綻に対し、防御的な作用を担うことが示唆される。これまで、肥満に伴う VAT-Treg の減少機構は、雄性で検討されてきた。しかし、雌性での肥満病態における VAT-Treg の変化、およびエストロゲンと VAT-Treg の関連は不明である。

Treg は常在する組織によって異なる遺伝子プロファイルを示す。VAT-Treg は peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) およびその関連遺伝子を発現することがよく知られている (Cipolletta et al., 2012)。さらに、VAT-Treg は特徴的なケモカイン関連遺伝子を発現する (Feuerer et al., 2009; Cipolletta et al., 2012)。また、Treg は局在する組織ごとに特異的なケモカインシグナルにより、各組織にリクルートされると考えられている (Yamada et al., 2012; Araujo-Pires et al., 2015; Chow et al., 2015)。したがって、VAT-Treg においてもその局在にケモカインシグナルの関与が示唆されるが、雌雄差を含む詳細な機構は不明である。

## 第 8 節 本研究の目的

肥満病態下では、脂肪組織の慢性炎症がインスリン抵抗性を誘導し、2 型糖尿病をはじめとする様々な代謝障害を惹起させる。当研究室ではこれまで、アルドステロン拮抗薬のエプレレノンが肥満マウスの糖代謝を改善することを報告してきた。そこで、本研究でははじめに、慢性炎症の誘導に中心的な役割を果たすマクロファージにおける MR の機能と発現に着目し、エプレレノンによる糖代謝改善機構を研究した。また、女性ホルモンのエストロゲンは、インスリン標的組織に直接作用するだけでなく、肥満病態下で慢性炎症を抑制する。しかし、雌性の肥満病態下での VAT-Treg の役割は不明である。そこで次に、閉経肥満モデルマウスを作製し、肥満病態における VAT-Treg の局在変化ならびにエストロゲンの VAT-Treg への影響を解析した。これらの研究により、ステロ

イドホルモンによる免疫細胞を介した脂肪組織の慢性炎症制御機構を探求し、糖尿病の新たな治療戦略の可能性を検証した。

## 第2章 鉱質コルチコイド受容体阻害剤によるマクロファージを介した糖代謝改善機構の解明

### 第1節 目的

肥満病態における糖代謝の悪化には、組織の慢性炎症が深く関与する。当研究室では、MR阻害薬エプレレノンが食餌性肥満マウスの脂肪組織と肝臓の慢性炎症を抑制し、糖脂質代謝を改善することを報告してきた。マクロファージはステロイドホルモンのグルココルチコイドにより、糖質コルチコイド受容体 (Glucocorticoid receptor; GR) を介してM2へと強く極性化される (Biswas et al., 2010)。一方、近年MR欠損マクロファージがM2極性の遺伝子発現プロファイルを示すことが報告された (Usher et al., 2010)。しかし、マクロファージにおけるMRの機能および発現は不明である。さらに、肥満に伴うインスリン抵抗性の進展にはIL1 $\beta$ 産生に関わるNLRP3インフラマソームが重要な役割を担うことから、本研究では食餌性肥満マウスを用いて、エプレレノンによるMR阻害がマクロファージの極性およびNLRP3インフラマソーム活性におよぼす影響を解析することで、糖代謝改善における分子機構を検討した。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 実験動物

雄性C57BL/6JマウスをJapan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan)より購入し、富山大学研究推進機構研究推進総合支援センター生命科学先端研究支援ユニット動物実験施設(12時間の明暗サイクル、22 $\pm$ 4 $^{\circ}$ C)にて飼育した。食餌および飲水は自由摂取させた。8週齢のマウスを通常食負荷群(chow)、Ep含有通常食負荷群(chow+Ep)、高脂肪食負荷群(HFD)およびエプレレノン含有高脂肪食負荷群(HFD+Ep)の計4群に分けて実験を行った。通常食としてCE-2(Clea Japan Inc., Tokyo, Japan)を、高脂肪食としてRodent diet with 60 kcal % fat (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA)を給餌した。エプレレノンは各食餌を粉碎後、1.67 g/kgの割合で混合し、給餌した(Iwanami et al., 2007; Nishioka et al., 2007; Wada et al., 2013)。実験は富山大学動物実験取り扱い規定に基づき実施した。

## 第 2 項 糖・インスリン負荷試験

食餌負荷 12 週後に糖負荷試験 (GTT) およびインスリン負荷試験 (ITT) を行った。GTT では 6 時間絶食ののちグルコース (2 g/kg body weight, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を、ITT では 4 時間絶食ののちヒトインスリン (0.75 U/kg body weight, Eli Lilly Japan., Kobe, Japan) を腹腔内投与し、投与後 0, 15, 30, 60 および 120 分における血糖値を測定した。血糖測定には ACCU-CHECK® Aviva Nano (Roche DC Japan K.K., Tokyo, Japan) を使用した。

## 第 3 項 核磁気共鳴画像法による体組成の解析

既報に基づき、高脂肪食負荷 12 週後に核磁気共鳴画像法 (MRI) による体組成解析を行った (Yonezawa et al., 2012)。撮影した T1 強調画像を Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて定量し、内臓脂肪、皮下脂肪および除脂肪体積を算出した。

## 第 4 項 小動物用代謝計測システムによるエネルギー代謝の計測

既報に基づき、高脂肪食負荷 11 週後に酸素消費量 ( $VO_2$ )、二酸化炭素排出量 ( $VCO_2$ ) および自発運動量を小動物用代謝計測システム (MK-5000RQ Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) を用いて計測した (Yonezawa et al., 2012; Sameshima et al., 2015)。自由摂食および自由飲水条件下で行った。

## 第 5 項 血圧測定

既報に基づき、高脂肪食負荷 12 週後にマウスの尾部における血圧および脈拍をマウス・ラット用無加温型非観血式血圧計 (MK-2000ST, Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) を用いて測定した (Yonezawa et al., 2012)。

## 第 6 項 深部体温測定

高脂肪食負荷 12 週後に熱電対温度計 (PTC-301, Unique Medical, Tokyo, Japan) のカニューレをマウスの肛門に挿入し、直腸温を測定した (Yonezawa et al., 2012; Ichihara et al., 2013)。



## 第 7 項 組織化学的解析

解剖時に摘出した精巣上体脂肪組織 (epididymal white adipose tissue, eWAT) および肝臓を 24 時間 10%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、パラフィン包埋した。6  $\mu\text{m}$  厚の切片を Hematoxylin-eosin (HE) 染色し、Image J を用いてマウス 1 匹あたり約 300 個の脂肪細胞径を定量した。また、パラフィン切片を hamstar anti-mouse CD11c 抗体 (1:100, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で 3 時間、goat anti-hamstar IgG 抗体 (1:100, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で 1 時間インキュベートし、CD11c の免疫染色を行った。マウスあたり 3~5 視野の crown-like structure (CLS) 数を計測し、1  $\text{mm}^2$  あたりの数として定量した。

## 第 8 項 フローサイトメトリーによる細胞分析

既報に基づき、解剖時に摘出した eWAT の間質血管分画 (SVF) におけるマクロファージの割合を FACS Canto II、および cell sorting には FACS Aria II (BD Bioscience) を用いて解析した (Sameshima et al., 2015; Onogi et al., 2017)。M1 マクロファージを 7AAD<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>細胞、M2 マクロファージを 7AAD<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup>細胞と定義した。細胞表面染色に用いた抗体を Table 1 に示す。マクロファージ内の MR 染色では、細胞表面を 4% PFA で固定後に細胞膜透過を行い、anti-mouse MR (H10E4C9F; Abcam) および anti-mouse IgG (H+L),F(ab')<sub>2</sub>-Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody (Cell Signaling) を用いて MR の細胞内染色を行った。データは FACS Diva 6.1.2 (BD Bioscience) および FCS Express (De Novo Software) により解析した。

**Table 1** フローサイトメトリー抗体リスト

抗体	標識色素	希釈倍率	購入会社
CD45	PE-Cy7	1:800	eBioscience
F4/80	APC-Cy7	1:100	BioLegend
CD11c	PE	1:100	BD Bioscience
CD206	APC	1:100	AbD setotec
7AAD		1:100	eBioscience

## 第 9 項 Real-time PCR

既報に基づき、RNA 抽出、逆転写および SYBR green による real-time PCR を行った (Wada et al., 2010; Yonezawa et al., 2012)。各遺伝子の発現量は、18s ribosomal RNA (*in vivo*) または hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HRPT) (*in vitro*) で補正した。用いたプライマーの配列を Table 2 に示す。

**Table 2** プライマー配列

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>Il1b</i>	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
<i>Il6</i>	ATGGAAACCACACGGTGACCT	TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT
<i>Tnfa</i>	AGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG
<i>Nlrp3</i>	CCACAGTGTAACCTGCAGAAGC	GGTGTGTGAAGTTCTGGTTGG
<i>Caspase 1</i>	GGCAGGAATTCTGGAGCTTCAA	GTCAGTCCTGGAAATGTGCC
<i>Ucp1</i>	TACCAAGCTGTGCGATGT	AAGCCCAATGATGTTTCAGT
<i>Pgc1a</i>	GCCCGGTACAGTGAGTGTTTC	CTGGGCCGTTTAGTCTTTCCT
<i>Cidea</i>	TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT	GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG
<i>Prdm16</i>	CTTCTCCGAGATCCGAAACTTC	GATCTCAGGCCGTTTGTCCAT
<i>18s rRNA</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Hprt</i>	GTCGTGATTAGCGATGATGAACC	GTCTTTCAGTCCTGTCCATAATCAG

CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor-like effector a; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; NLRP3, Nod-like receptor, pyrin domain containing 3; PGC1a, peroxisome proliferator-activated receptor g coactivator 1a; PRDM16, PR-domain-containing 16; UCP1, uncoupling protein 1; TNFa, tumor necrosis factor a

## 第 10 項 Western blotting

eWAT および肝臓をホモジナイズし、Lysis buffer [20 mM Tris, 140 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2.5 mM Sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -Glycerophosphate, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50 mM Sodium fluoride, 0.62% Aprotinin, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH7.4] を 600  $\mu\text{L}$  加え、氷上で静置した。BMDM には Lysis buffer を 300  $\mu\text{L}$  添加し、セルスクレーパー

を用いて剥離した細胞を氷上で静置しながら、10分ごとに3回ボルテックスを行い溶解させた。組織または BMDM-Lysis buffer を 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離することで不溶成分を取り除き、上清を細胞溶解液とした。細胞溶解液に DTT-Laemmli buffer を混和し、5 分間煮沸した。上記の方法により作製したサンプルを、100 V で 105 分間ポリアクリルアミド電気泳動し、タンパクを分離した。Bio-Rad transblot 装置を用い、Polyvinylidenedifluoride membrane (Millipore., Bedford, MA, USA) に 100 V で 64 分間転写した。転写後の Membrane は 5% BSA または 5% non-fat milk/TBS-T にて室温で 90 分間ブロッキングした。4°C で 16 時間、Membrane を一次抗体溶液でインキュベートし、TBS-T で洗浄した。一次抗体として用いた anti-NFκB p65 抗体、anti-Caspase 1 抗体、anti-IL1β抗体および anti-MR 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。anti-pNFκB p65 (Ser536) 抗体および anti-β-actin 抗体は Cell Signaling Technology から購入した。Horse radish peroxidase (HRP) 標識抗マウスまたは抗ウサギ IgG 抗体 (二次抗体: GE Healthcare Ltd., England, UK) と室温で 1 時間反応させ、ChemiLumi-One (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を用いた化学発光法によるルミノイメージアナライザー LAS-4000 mini (GE Healthcare Ltd., England, UK) にて検出した。

## 第 11 項 ELISA による免疫学的解析

解剖時、麻酔科で下大静脈からヘパリンコートしたシリンジを用いて採取した血液を 1,500 ×g で 20 分間遠心し、血漿を得た。肝臓のトリグリセリド定量には、ホモジナイズ後にクロロホルム/メタノール抽出を行った。血中のコレステロール値および血中と肝組織中のトリグリセリド値はコレステロール E-テストワコーおよびトリグリセライド E-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて測定した。グルコース応答性インスリン分泌の定量は、GTT における 0, 15 および 30 分値に血液を採取し、遠心分離により得た血漿をマウスインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Kanagawa, Japan) を用いて行った。

## 第 12 項 骨髄由来マクロファージの培養

8-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨および脛骨より骨髄細胞 (BMC) を単離した。BMC は fetal bovine serum (FBS) を 10%、およびマクロファージ分化に重要な macrophage colony-stimulating factor (MCSF) を多量に含む L929 細胞培養上清を

20%含有する RPMI メディウムで約 7 日間培養し、骨髄由来マクロファージ (BMDM) へと分化させた (Schiller et al., 2004; Onogi et al., 2017)。血清中のステロイドホルモンの影響を排除するため、培養 3-4 日目に Charcoal-stripped FBS (Biological Industry, Crownwell, CT, USA) を用いた培養液に交換した。BMDM に 10 ng/mL の interferon gamma (IFN $\gamma$ ) と 100 ng/mL の lipopolysaccharide (LPS)、または 10 ng/mL の IL4 を 36 時間刺激することで極性を誘導し、それぞれ M1-BMDM および M2-BMDM と定義した。非刺激細胞は M0-BMDM とした。MR のノックダウン実験では、BMDM に対し 50 nM の siRNA または scrambled negative control (Thermo Fisher Scientific) を導入した。導入試薬には、TransIT-TKO<sup>®</sup> Transfection Reagent (Mirus Bio LLC., WI, USA) および Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Media (Thermo Fisher Scientific) を用い、24 時間処置した。

### 第 13 項 蛍光強度測定による細胞内活性酸素種の定量

BMDM を無血清 RPMI にて 96 穴プレートに播種した。30 分間エプレレノンを経前処理し、 $10^{-10}$  M のアルドステロンまたは 100 ng/mL の LPS を処置した。PBS (-) で洗浄後、5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA; Life Technologies, California, USA) 溶液で 1 時間、その後 10% FBS 含有 RPMI に交換して 1 時間インキュベートした。細胞内活性酸素種 (ROS) は、マルチモード・プレートリーダー FilterMax F5 (Molecular Devices Japan., Tokyo, Japan) を用いて蛍光強度を検出することにより定量した。

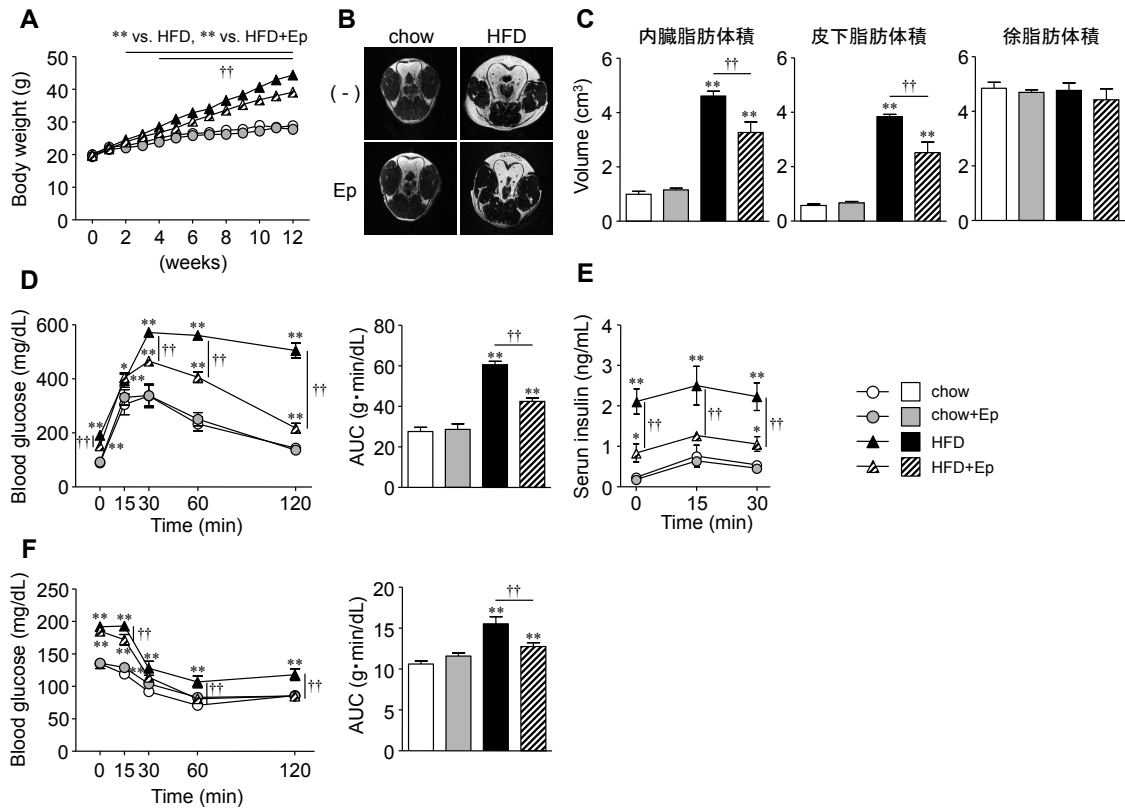
### 第 14 項 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。one-way ANOVA による分散分析を行ったのち、Bonferroni's test による多重検定比較を行った。 $P < 0.05$  を有意とした。

### 第3節 結果

#### 第1項 エプレレノンがマウスの体組成および糖代謝に与える影響

はじめに、エプレレノンが通常食または高脂肪食負荷マウスの体重増加および体組成に与える影響を検討した (Figure 3A-C)。HFD+Ep 群では、HFD 群に認められる体重増加が投与4週目より有意に抑制された (Figure 3A)。このことに一致して、HFD 群における内臓脂肪および皮下脂肪蓄積は、HFD+Ep 群で抑制された (Figure 3B, C)。一方、除脂肪体積には差異を認めなかった (Figure 3B, C)。また、HFD+Ep 群において、HFD 群に認められる耐糖能異常とインスリン抵抗性の著明な改善、およびグルコース応答性インスリン分泌の抑制を認めた (Figure 3D-F)。以上より、エプレレノンは食餌性肥満マウスの体重増加および糖代謝異常を改善することが示された。



**Figure 3**

**Effects of eplerenone on body weight gain, body fat composition and glucose metabolism in mice.** (A, B and C) Four groups of mice (chow mice: open symbols, chow+Ep mice: gray symbols, HFD mice: black symbols, HFD+Ep mice: hatched symbols) were used. Transition of body weight ( $n = 17-19$  per group) (A), representative T1-weighted axial slices of MRI at the level of the urinary bladder (B), and quantified volumes of visceral and subcutaneous fat and lean mass from the diaphragm to the anus (C) are shown ( $n = 6-9$  per group). (D) GTT (2 g of glucose/kg body weight, i.p.) was conducted in 6 h-fasted mice after 12 weeks of HFD-feeding. The averaged glucose area under the curve (AUC) over the course of 120 min in each group was shown ( $n = 6-9$  per group). (E) Insulin levels at 0, 15, 30 min in GTT are shown. (F) IIT (0.75 units of insulin/kg body weight, i.p.) was conducted in 4 h-fasted mice. The averaged AUC over the course of 120min for each group are shown ( $n = 7-8$  per group). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the chow mice; †† $P < 0.01$ , significantly different between HFD and HFD+Ep mice.

## 第 2 項 エプレレノンが血圧、組織重量および血清パラメーターに与える影響

負荷 12 週後における各マウスの血圧および心拍数を測定した。HFD+Ep 群において HFD 群に認められる収縮期および拡張期の血圧上昇が抑制され、エプレレノンの高血圧治療薬としての作用を示した。一方、心拍数においてエプレレノン投与による変化は認められなかった (Table 3)。また、体重変化に一致して、HFD+Ep 群では HFD 群に認められる精巣上体白色脂肪組織 (eWAT)、鼠径部白色脂肪組織 (iWAT) および肝臓の重量増加が有意に抑制された。さらに、HFD+Ep 群において血中コレステロール値が減少した (Table 3)。これらの結果から、エプレレノンは高脂肪食負荷マウスの脂質代謝を改善させると考えられた。

**Table 3 Characteristics of mice at 12 weeks of the experimental period**

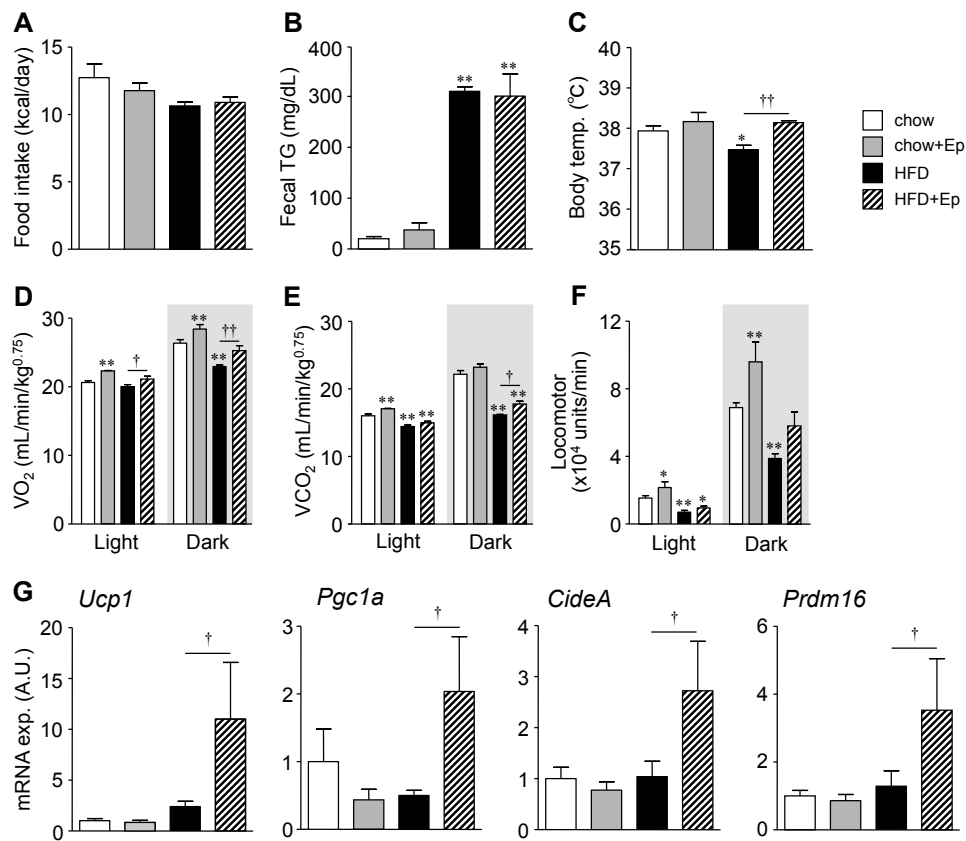
	chow	chow+Ep	HFD	HFD+Ep
Systolic blood pressure (0 week), mmHg	72.7 ± 1.65	72.9 ± 2.26	72.4 ± 2.79	77.6 ± 1.83
Systolic blood pressure (12 weeks), mmHg	85.7 ± 3.60	85.4 ± 2.17	112 ± 2.20 **	94.5 ± 2.71 ††
Diastolic blood pressure (0 week), mmHg	29.1 ± 3.69	31.9 ± 2.67	30.2 ± 1.45	33.9 ± 4.36
Diastolic blood pressure (12 weeks), mmHg	43.1 ± 5.09	36.7 ± 4.86	64.0 ± 4.65 **	41.6 ± 4.44 ††
Heart rate (0 weeks), bpm	708 ± 18.7	662 ± 19.9	677 ± 17.3	679 ± 22.6
Heart rate (12 weeks), bpm	597 ± 34.3	542 ± 38.8	694 ± 11.5 **	677 ± 28.2 **
eWAT weight, g	0.48 ± 0.03	0.35 ± 0.06	2.74 ± 0.12 **	2.40 ± 0.07 ** ††
iWAT weight, g	0.25 ± 0.01	0.21 ± 0.02	2.47 ± 0.12 **	1.53 ± 0.10 ** ††
Liver weight, g	1.04 ± 0.02	0.98 ± 0.03	1.63 ± 0.11 **	1.40 ± 0.04 ** ††
Plasma triglycerides, mg/dL	90.5 ± 6.23	82.9 ± 12.6	55.4 ± 4.67 **	44.1 ± 3.37 **
Plasma cholesterol, mg/dL	71.0 ± 4.04	69.6 ± 2.30	173 ± 5.58 **	118 ± 2.53 ** ††

Data are shown as the mean ± S.E. (tissue weights, n = 17-19; others, n = 6-9). C57BL/6J mice were fed chow or HFD with or without eplerenone (Ep) for 12 weeks. \*\**P* < 0.01, significantly different from chow. †*P* < 0.05 and ††*P* < 0.01, significantly different from HFD.



### 第 3 項 エプレレノンがマウスのエネルギー代謝に与える影響

エプレレノンが食餌性肥満を軽減させたメカニズムを明らかにするため、マウスのエネルギー代謝を検討した。摂食量は 4 群間に差異を認めず、糞便中のトリグリセリド含有量はエプレレノン投与による影響を認めなかった (Figure 4A, B)。したがって、エプレレノン投与はマウスの摂食および排泄カロリーに影響を与えないと考えられた。一方、直腸温測定では、HFD+Ep 群において HFD 群に認められる体温低下が防止されることが示された (Figure 4C)。そこで各マウスの酸素消費量 ( $VO_2$ )、二酸化酸素排出量 ( $VCO_2$ ) および自発運動量を測定したところ、HFD+Ep 群では HFD 負荷に伴うこれらエネルギー代謝の低下を回復させることが明らかとなった (Figure 4D-F)。さらに、体温上昇およびエネルギー代謝の亢進に一致して、HFD+Ep 群では褐色脂肪組織における熱産生関連遺伝子発現の増加を認めた (Figure 4G)。以上より、エプレレノンは高脂肪食負荷マウスのエネルギー代謝を亢進させることで、脂肪蓄積に対し防御的に働くことが示唆された。

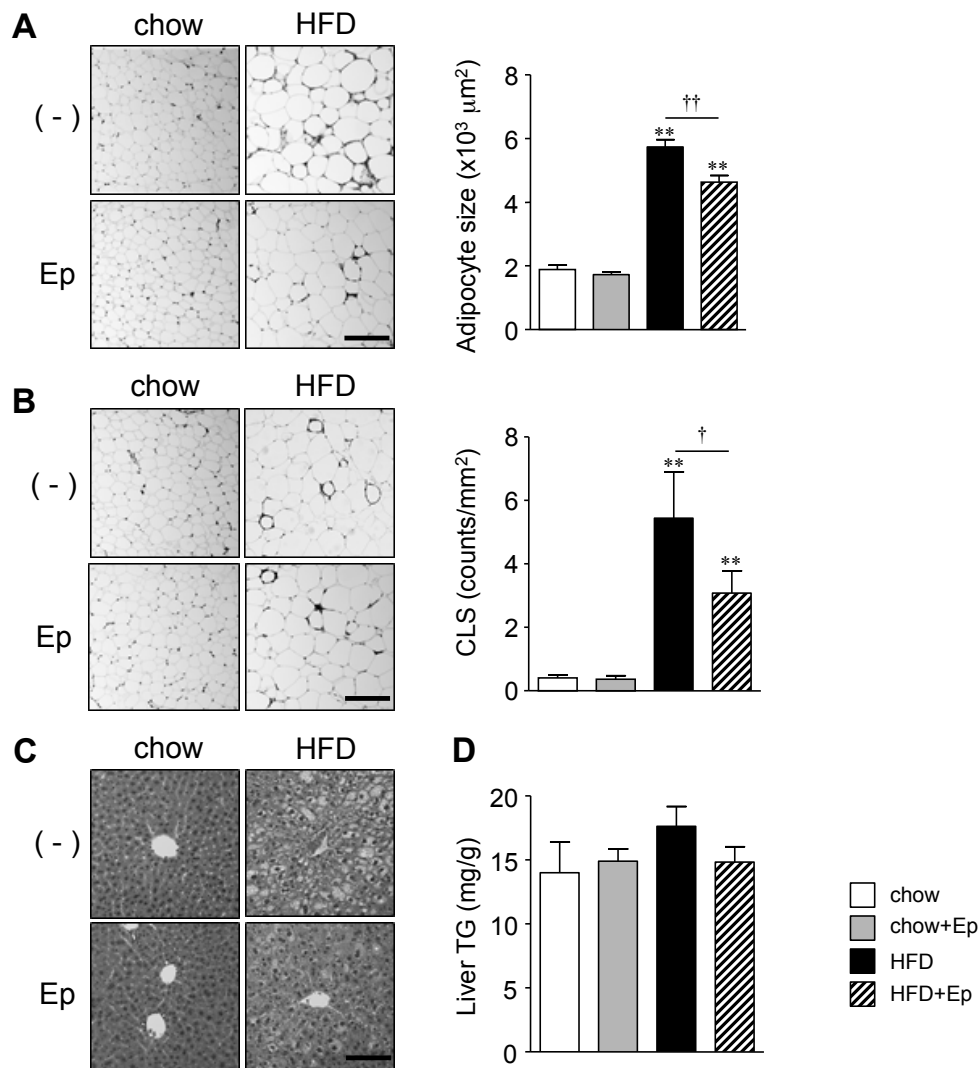


**Figure 4**

**Effects of eplerenone on the energy metabolism in mice.** Four groups of mice (chow mice: open columns, chow+Ep mice: gray columns, HFD mice: black columns, HFD+Ep mice: hatched columns) were used. Daily food consumption (A), triglyceride (TG) content in the feces (B) and core body temperature (C) in each group are shown. Oxygen consumption (VO<sub>2</sub>) (D), carbon dioxide production (VCO<sub>2</sub>) (E) and spontaneous locomotor activity (F) in the light and dark phase analyzed by metabolic chamber are shown. (G) mRNA expression of thermogenesis-related genes in the brown adipose tissue are shown. Data are shown as the mean ± S.E. (n = 4-10). \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01, significantly different from chow mice; †*P* < 0.05 and ††*P* < 0.01, significantly different between HFD and HFD+Ep mice.

#### 第 4 項 エプレレノンがマウスの内臓脂肪組織および肝臓の組織学的変化に与える影響

高脂肪食負荷とエプレレノン投与による脂肪蓄積変化 (Figure 3B, C, Table 2) を組織学的に解析するため、eWAT と肝臓における HE 染色および CD11c 免疫染色を行った (Figure 5)。eWAT の HE 染色により、HFD+Ep 群では HFD 群に認められる脂肪細胞の肥大化が抑制された (Figure 5A)。CD11c 免疫染色の結果、chow 群および chow+Ep 群において CD11c 陽性マクロファージはほとんど認められなかった (Figure 5B)。しかし、HFD 群では細胞死に至った脂肪細胞を CD11c 陽性マクロファージが取り囲む crown-like structure (CLS) を多数認め、HFD+Ep 群では本変化が抑制されたことから (Figure 5B)、エプレレノン投与は高脂肪食負荷に伴う脂肪組織慢性炎症を軽減させることが示唆された。さらに、肝臓の HE 染色では、HFD+Ep 群において HFD 誘導性の肝脂質蓄積の抑制が認められた (Figure 5C)。肝トリグリセリド含有量は 4 群間で有意な差異を認めなかったが、組織学的解析に一致して、HFD+Ep 群における抑制傾向を示した (Figure 5D)。



**Figure 5**

**Histological analysis in the eWAT and liver of mice.** Four groups of mice (chow mice: open columns, chow+Ep mice: gray columns, HFD mice: black columns, HFD+Ep mice: hatched columns) were used. (A) Representative photomicrograph of hematoxylin and eosin (HE)-stained sections of the eWAT, and the averaged size of adipocytes. Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ . (B) Representative photomicrograph of the eWAT immunostained with anti-CD11c antibody, and the number of crown-like structure (CLS). Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ . (C) Representative photomicrograph of HE-stained sections of the liver. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (D) Triglyceride content in the liver. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 8-12$ ). \*\* $P < 0.01$ , significantly different from chow mice; † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ , significantly different between HFD and HFD+Ep mice.

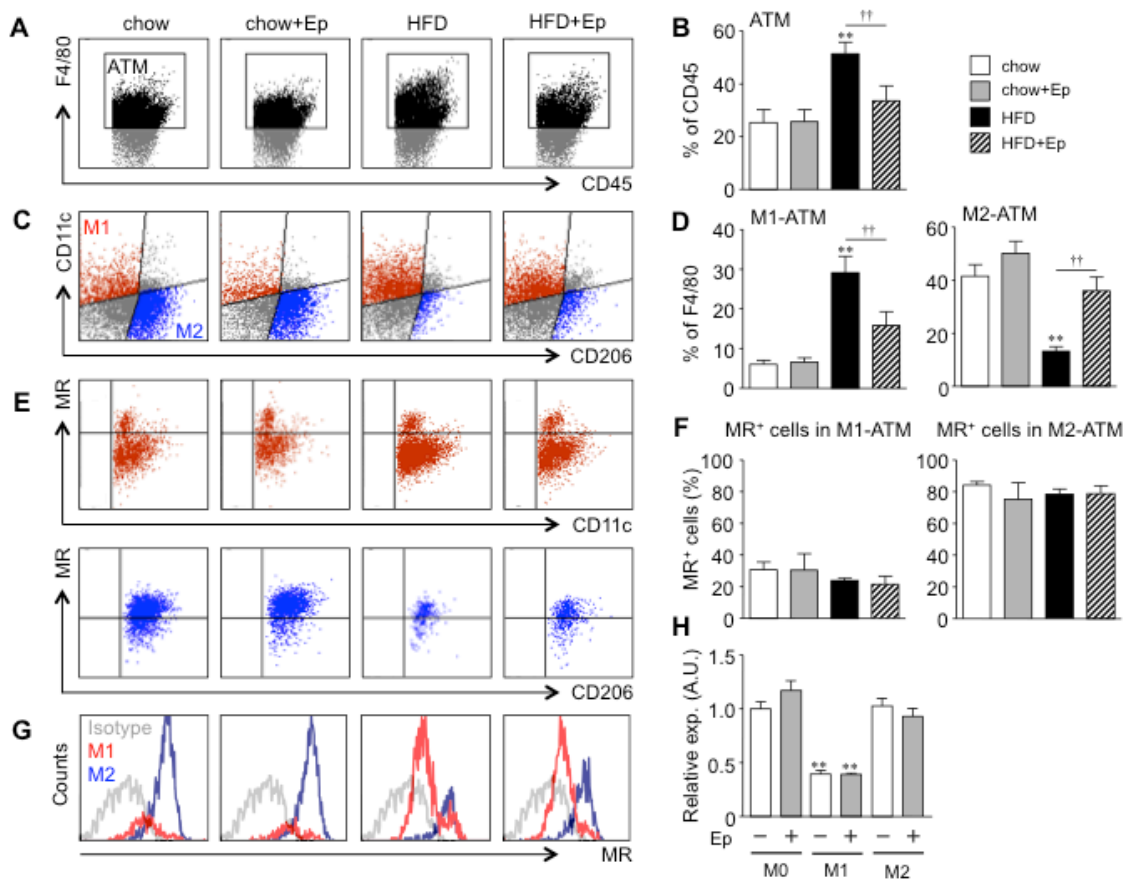
## 第5項 エプレレノンが脂肪組織マクロファージの極性と鉱質コルチコイド受容体発現に与える影響

エプレレノンが脂肪組織マクロファージ (ATM) の極性に与える影響をフローサイトメトリーにより解析した (Figure 6A-D)。F4/80 陽性の ATM は、HFD 群において著明に増加した (Figure 6A, B)。既報に一致して (Fujisaka et al., 2009)、HFD 群では ATM 中の CD11c 陽性 M1-ATM の割合は増加し、CD206 陽性 M2-ATM は減少した (Figure 6C, D)。一方、HFD+Ep 群では高脂肪食負荷による総 ATM および M1-ATM の増加と、M2-ATM の減少が有意に抑制された (Figure 6A-D)。

骨髄特異的 MR 欠損マウス由来のマクロファージは、M2 マクロファージ様の遺伝子プロファイルを示すことが報告されている (Usher et al., 2009)。しかし、肥満マウスの M1 および M2-ATM における実際の MR 発現は不明であった。そこで、フローサイトメトリーを用いて各マウスの M1 または M2-ATM における MR 発現を検討したところ、MR 陽性 M1-ATM は 20-30%であるのに対し、M2-ATM の約 80%が MR 陽性細胞であることが明らかとなった (Figure 6E, F)。また、これらの発現は食餌性肥満やエプレレノン投与の影響を受けなかった (Figure 6E, F)。さらに、M1 および M2-ATM における MR の蛍光強度を調べると、いずれの群においても M1-ATM と比較し M2-ATM において強い MR 蛍光強度を認めた (Figure 6G)。

マクロファージ極性と MR 発現の関連を明らかにするため、*in vitro* で極性化 BMDM の MR mRNA 発現を検討した (Figure 6H)。*in vivo* に一致して、MR mRNA 発現は無極性化である M0 および M2-BMDM と比較し、M1-BMDM において顕著に低いことが示された。また、エプレレノンは BMDM の MR 発現に影響を与えなかった (Figure 6H)。

これらの結果から、エプレレノンは肥満マウスの ATM を M2 極性へと誘導するが、マクロファージの MR 発現には影響しないこと、および MR 発現は M1 マクロファージにおいて減少することが示された。

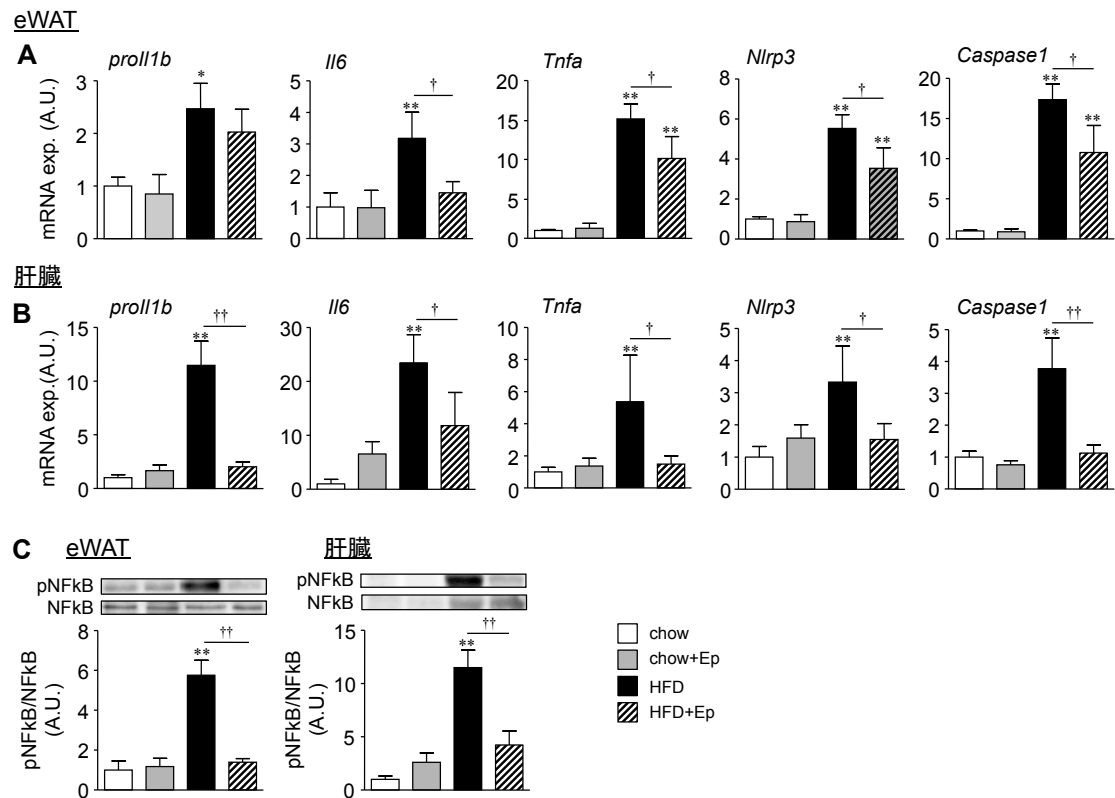


**Figure 6**

**Effects of eplerenone on the polarity of macrophages and their MR expression in the eWAT of mice.** Flow cytometry analysis was conducted, using stromal vascular cells in the eWAT from four groups of mice (chow mice: open columns, chow+Ep mice: gray columns, HFD mice: black columns, HFD+Ep mice: hatched columns). (A, B, C and D) Representative dot plots of total macrophages (A), CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> M1- and CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> M2-ATM (C), and respective quantitative data (B and D) are shown. (E and F) Representative dot plots of MR-positive cells in the M1- and M2-ATM (E), and quantitative data (F) are shown. (G) Analysis of MR fluorescence intensity in the M1- and M2-ATM. Data are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. (n = 6-9) \*\* $P$  < 0.01, significantly different from chow mice; †† $P$  < 0.01, significantly different between HFD and HFD+Ep mice. (H) mRNA expression of *Mr* in M0-, M1-, and M2-polarized BMDM. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. (n = 4). \*\* $P$  < 0.01, significantly different from Ep-untreated M0-BMDM.

## 第 6 項 エプレレノンが内臓脂肪組織および肝臓の慢性炎症に与える影響

IL1 $\beta$ の産生機構である NLRP3 インフラマソームの活性化は、まず Signal 1 として PAMP 刺激により NF $\kappa$ B がリン酸化され、*proIl1b* やインフラマソーム構成成分である *Nlrp3* および *Caspase 1* の転写が促進される (Latz et al., 2013; Lackey et al., 2016)。エプレレノンが肥満に関連する慢性炎症に与える影響を検討するため、eWAT および肝臓における炎症関連遺伝子の発現を解析した。炎症性サイトカインの *proIl1b*、*Il6* および *Tnfa*、ならびに *Nlrp3* および *Caspase 1* の発現は、eWAT と肝臓いずれにおいても HFD 群で有意に増加し、HFD+Ep 群において抑制された (Figure 7A, B)。さらに、HFD 群では eWAT および肝臓で NF $\kappa$ B のリン酸化増強が認められたが、これらはいずれも HFD+Ep 群で低下した (Figure 7C)。以上より、エプレレノンは Signal 1 による NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害すると考えられた。



**Figure 7**

**Eplerenone attenuates diet-induced chronic inflammation in the eWAT and liver of mice.** Four groups of mice (chow mice: open columns, chow+Ep mice: gray columns, HFD mice: black columns, HFD+Ep mice: hatched columns) were used. (A and B) mRNA expression levels of proinflammatory and NLRP3-inflammasome-related genes in the eWAT (A) and liver (B) of each group are shown. (C) Phosphorylation levels of NFkB in the eWAT and liver of each group are shown. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. (n = 6-9). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from chow mice; † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ , significantly different between HFD and HFD+Ep mice.



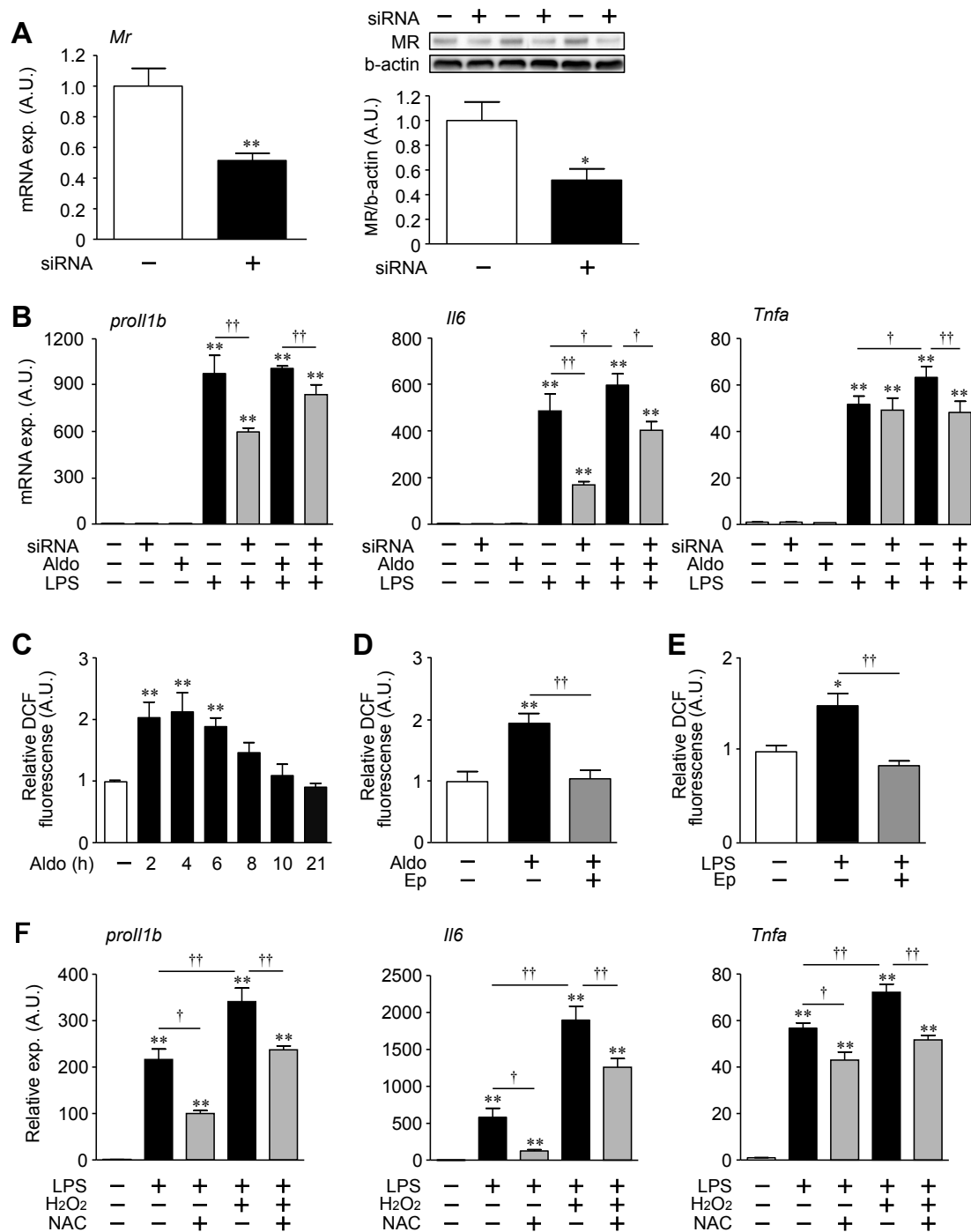
## 第7項 鉱質コルチコイド受容体の阻害が骨髄由来マクロファージの炎症性サイトカイン発現および活性酸素産生に与える影響

エプレレノンによる抗炎症効果のメカニズムを、siRNAによりMRノックダウンを行ったBMDMを用い、*in vitro*で解析した。MRのsiRNAを導入したBMDMでは、MRのmRNAとタンパク質はともに約50%の発現低下を認めた (Figure 8A)。LPS誘導性の *proIl1b* および *Il6* 発現はMRノックダウンにより顕著に抑制された (Figure 8B)。アルドステロン単独処置による炎症性サイトカインの発現増加は認められなかったが、LPS刺激に対するアルドステロン前処置はLPS誘導性の *Il6* および *Tnfa* 発現を増強し、MRノックダウンにより抑制された (Figure 8B)。したがって、MRはBMDMにおける炎症性サイトカイン発現調節に直接関与することが示唆された。

さらに、炎症増強に関連するシグナルとして、ROSの関与を検討した (Figure 8C-F)。BMDMに対するアルドステロンの処置は、処置後2~6時間においてROS産生を誘導した (Figure 8C)。一方、エプレレノンはアルドステロンによるROS産生を有意に抑制した (Figure 8D)。また、LPS処置によってもROS産生が増強され、エプレレノンはこれを阻害した (Figure 8E)。実際に、BMDMにおいてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はLPS誘導性の炎症性サイトカイン発現を増強し、抗酸化剤N-acetyl-cysteine (NAC)によるROSの消去はLPS単独およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により増強された炎症性サイトカイン発現を有意に抑制した (Figure 8F)。

---

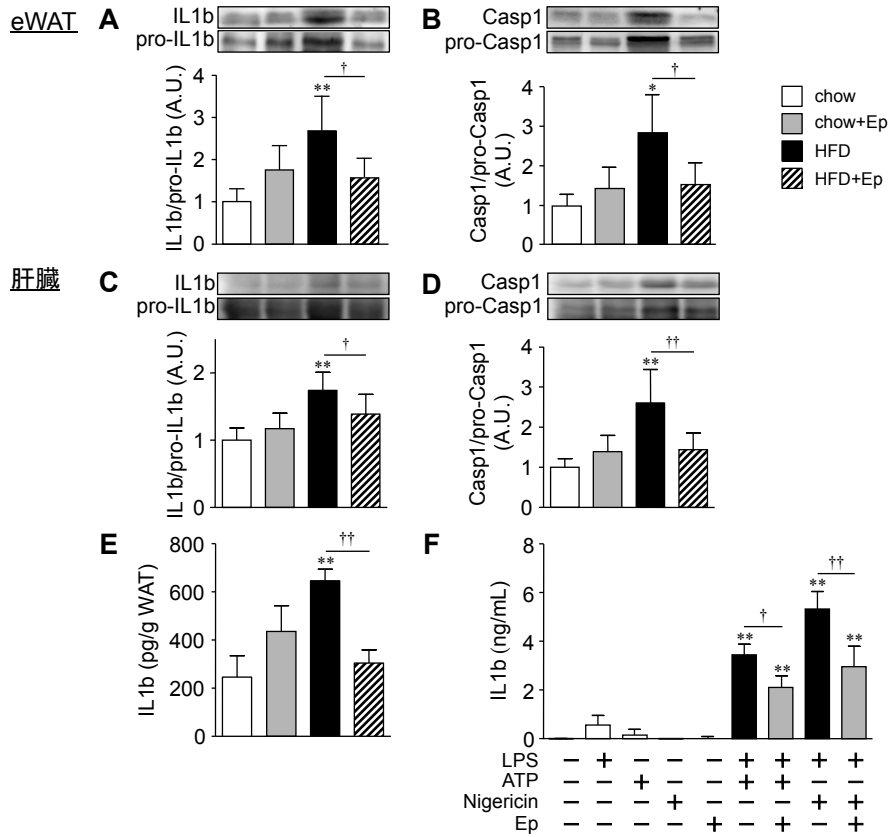
**Figure 8**  
**Influences of MR inhibition on the proinflammatory cytokine expression and ROS production in BMDM.** (A) Efficiency of siRNA-mediated knockdown of MR in BMDM. (B) Effects of MR-knockdown on proinflammatory cytokine expression in BMDM. Serum-starved BMDM transfected with MR-siRNA and scrambled control were pretreated with aldosterone (Aldo) for 18 h, and subsequently stimulated with LPS for 3 h. Then, mRNA expression of *ProIl1b*, *Il6* and *Tnfa* was analyzed. (C) The time-course of Aldo-induced ROS productions in the BMDM. (D, E) Effects of eplerenone (Ep) pretreatment on the ROS production induced by Aldo (D) and LPS (E). BMDM was stimulated with aldosterone or LPS. Eplerenone was treated 30 min prior to the stimulation. Intracellular ROS level was analyzed by colorimetric assay. (A-E) Data are shown as the mean±s.e.m. (n=4-12). (F) BMDM was serum-starved and pre-treated with NAC for 30 min. Then,



cells were treated with 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 3 h.  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added every 30 min to maintain the effects to avoid the rapid disappearance. The cells were then stimulated with LPS for 3 h, and harvested. The mRNA expressions of *Il1b*, *Il6*, and *Tnfa* were analyzed by real-time PCR. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from untreated cells; † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ , significantly different between two groups, as indicated.

## 第 8 項 エプレレノンが内臓脂肪組織および肝臓における NLRP3 インフラマソーム活性化に与える影響

ROS は NLRP3 インフラマソーム形成における代表的なトリガリング刺激 (Signal 2) のひとつである (Dostert et al., 2008)。また、肥満病態において NLRP3 インフラマソームの活性化により過剰産生された IL1 $\beta$ は、インスリン抵抗性の進展に深く関与することが報告されている (Stenstra et al., 2010; Stenstra et al., 2011)。そこで、エプレレノンが Signal 2 に関連したインフラマソーム活性化に与える影響を検討した。Signal 2 によって切断され活性体となる IL1 $\beta$ および Caspase 1 は、HFD 群の eWAT および肝臓において有意に増加したが、HFD+Ep 群では抑制された (Figure 9A-D)。また、*ex vivo* での eWAT 培養条件下において、培養上清中に分泌された IL1 $\beta$ 量も同様の結果を示した (Figure 9E)。さらに、Signal 2 を介した NLRP3 インフラマソーム活性化に対し、エプレレノンがマクロファージに与える直接的な作用を検討するため、BMDM を用いた *in vitro* 実験を行った (Figure 9F)。BMDM にまず Signal 1 として LPS にて刺激し、洗浄後に Signal 2 として ATP もしくは Nigericin 刺激を行った。Signal 2 刺激の 30 分前にエプレレノン処置することで、Signal 1 に対するエプレレノンの影響を排除した。LPS、ATP または Nigericin の単独処置による IL1 $\beta$ 産生は認められなかったが、Signal 1 と Signal 2 の両刺激により IL1 $\beta$ 産生が増加し、エプレレノンはこれらを有意に抑制した (Figure 9F)。以上より、エプレレノンは Figure 7 および 8 で述べた Signal 1 に対する阻害作用とは独立して、Signal 2 による NLRP3 インフラマソームの活性化を直接阻害することが明らかとなった。



**Figure 9**

**Effects of eplerenone on the Signal 2-mediated NLRP3 inflammasome activation in the eWAT and liver of mice.** (A, B, C, D and E) Four groups of mice (chow mice: open columns, chow+Ep mice: gray columns, HFD mice: black columns, HFD+Ep mice: hatched columns) were used. (A, B, C and D) Protein amounts of IL1b and mature caspase 1 in the eWAT and liver. (E) Secreted IL1b levels in the media of ex vivo-cultured eWAT. Data are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. (n = 3-7). \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.01, significantly different from chow mice; † $P$  < 0.05 and †† $P$  < 0.01, significantly different between HFD and HFD+Ep mice. (F) Effects of eplerenone on the Signal 2-mediated inflammasome activation in vitro. BMDM was stimulated with LPS for 3 h, and subsequently treated with ATP or Nigericin for 40 min. Eplerenone was treated 30 min prior to the addition of ATP or nigericin. Secreted IL1b levels in the culture media were analyzed. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. (n = 5). \*\* $P$  < 0.01, significantly different from untreated cells; † $P$  < 0.05 and †† $P$  < 0.01, significantly different between two groups, as indicated.

## 第4節 考察

肥満誘導性の RAAS の活性化は、インスリン抵抗性を誘導し、様々な代謝異常に深く関与する (Favre et al., 2015)。これまで、その機序はアンジオテンシンⅡの作用によると考えられてきた。本研究では、アルドステロンがアンジオテンシンⅡとは独立して糖代謝異常の誘導に関与することを示した。エプレレノンはマウスのエネルギー代謝を亢進させることで食餌性肥満を軽減させ、eWAT において高脂肪食誘導性の M1-ATM の増加と M2-ATM の減少を抑制した。その機序として、MR 阻害は NLRP3 インフラマソームに関連する Signal 1 および 2 の両刺激を抑制し、肥満マウスの eWAT と肝臓における慢性炎症を改善することが明らかとなった。本知見は MR 阻害が肥満病態におけるインスリン抵抗性を改善する新たな機構を示すものである。

脂肪細胞特異的 MR 過剰発現マウスはメタボリックシンドローム病態を呈することが知られている (Urbanet et al., 2015)。したがって、脂肪細胞は MR 活性化による糖代謝異常の標的細胞であると考えられてきた。このことに関連して、当研究室ではアルドステロンが 3T3-L1 脂肪細胞において ROS 誘導性のインスリン抵抗性を促進させることを報告した (Wada et al., 2009)。また、MR 阻害剤は脂肪組織における細胞内 ROS の減少、および善玉アディポカインであるアディポネクチンの増加により肥満誘導性のインスリン抵抗性を改善することが報告されている (Guo et al., 2008; Hirata et al., 2009)。さらに、MR は PPAR $\gamma$  および CCAAT/enhancer-binding protein a (C/EBP $\alpha$ ) 発現を誘導し、脂肪細胞分化を促進させる (Marzolla et al., 2012)。このことに一致して、MR のノックダウンおよび阻害が脂肪細胞分化と脂質蓄積を抑制することが報告されている (Caprio et al., 2007; Caprio et al., 2010)。これらの報告より、本研究においてエプレレノンは、脂肪細胞分化の制御により脂肪蓄積を減少させた可能性が想定される (Figure 3)。

その一方で、エプレレノンは高脂肪食負荷による深部体温およびエネルギー代謝の低下を改善することを示した (Figure 4)。MR による熱産生調節機構に関し、近年 Twik-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) 欠損マウスを用いた成績が報告された (Pisani et al., 2016)。TASK1 は pH 感受性のカリウムチャネルであり、 $\beta$ 3 アドレナリン受容体刺激による BAT における UCP1 発現と酸素消費を媒介する。肥満糖尿病病態では TASK1 の発現低下により UCP1 発現が減弱するが、エプレレノンは TASK1 欠損マウスの UCP1 発現を回復させた。本機構はエプレレノン投与が BAT の熱産生関連遺伝子発現を著明に増加させた一因と考えられる。また、高脂肪食負荷マウスに対する MR 阻害剤の投与は、オートファジー活性の低下に伴い内臓脂肪および皮

下脂肪組織において熱産生機能を有するベージュ脂肪細胞の産生を誘導することが報告されている (Armani et al., 2014)。しかし、本実験系において脂肪細胞のベージュ化は認められなかった (data not shown)。褐色およびベージュ脂肪細胞の機能は肥満病態の代謝変化に大きく影響するため、熱産生に関わるこれらの機構についてさらなる検討が必要と考えられる。

GR やエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) などのステロイドホルモン受容体がマクロファージの極性や炎症プロファイルの調節に重要な役割を担うことが報告されている (Ogawa et al., 2005; Ribas et al., 2011)。また、マクロファージの MR は ER $\alpha$  の発現制御を担うことが報告され (Zhang et al., 2017)、ステロイドホルモン受容体間での相互作用も示唆される。本研究において、高脂肪食負荷マウスへのエプレレノン投与は、ATM 極性を M1 から M2 へと誘導した (Figure 6)。一方で、BMDM に対するエプレレノン処置および MR ノックダウンは、BMDM 極性に影響を与えなかった (data not shown)。これらの結果から、エプレレノン投与による ATM 極性の変化は、マクロファージの MR 阻害による直接作用ではなく、食餌性肥満が軽減されたことによる二次的な影響であると考えられる。

骨髄細胞特異的 MR 欠損マウスのマクロファージは M2 様の遺伝子プロファイルを示すことが報告されており (Usher et al., 2010)、MR は M1-ATM において高発現することが推測された。しかし、仮説に反して MR 発現は M2-ATM および M2-BMDM と比較し、M1-ATM および M1-BMDM において低値であった (Figure 5)。核内受容体の包括的な遺伝子発現解析において、マクロファージにおける MR 発現は LPS 刺激により負に制御されることが示されている (Barish et al., 2005)。よって、マクロファージの MR 発現は炎症シグナルによって抑制されると考えられる。一方、本研究では MR の阻害が *in vivo* および *in vitro* いずれにおいてもマクロファージの炎症性サイトカイン発現を減弱させた。肥満マウスの脂肪組織と肝臓において、M1 マクロファージにおける MR 発現が低下しているにもかかわらず、その活性化により炎症性サイトカイン発現を強く促進すると考えられる。

エプレレノンは、NLRP3 インフラマソームの活性化に寄与する Signal 1 と Signal 2 をそれぞれ独立して阻害することで、マクロファージの IL1 $\beta$ 産生を強力に抑制した。特に、エプレレノンによる Signal 2 を介した活性化の阻害は、ROS 産生の抑制に起因することが強く示唆された。また、薬理的な高濃度のアルドステロン投与マウスの腎臓において産生される IL1 $\beta$ と、これに伴う尿細管間質障害をエプレレノン投与が抑制したことから、アルドステロン自体が NLRP3 インフラマソームを活性化させることが示されている (Kadoya et al., 2015)。したがって、エプレレノンは NLRP3 インフラマ

ソーム阻害剤としても有効に作用する可能性が考えられる。肥満や糖尿病病態において、インフラマソームの活性化による過剰な IL1 $\beta$ の産生がインスリン抵抗性を進展させることが明らかとなっており (Maedler et al., 2002)、エプレレノンはこの機構を抑制することで肥満マウスの代謝異常を改善すると考えられる。今後、MR 阻害によるこれらの効果がヒトにおいても有効であるか検討することが求められる。

## 第 5 節 小括

本研究によって、肥満病態の代謝異常に対する MR 阻害剤の有益な作用が明らかとなった。そのメカニズムとして、エプレレノンが体内の肥満環境により誘導される NLRP3 インフラマソームの活性化を直接阻害することを提示した。以上より、肥満や 2 型糖尿病をはじめとするインフラマソーム関連疾患に対し、MR が新たな治療戦略の標的となる可能性が見出された。





## 第3章 内臓脂肪組織における肥満に伴う制御性 T 細胞局在変化の雌雄差とその機序の解明

### 第1節 目的

肥満病態における糖代謝の制御には、性差が存在する。また肥満病態において、脂肪組織慢性炎症の亢進が糖代謝異常の進展に深く関与する。内臓脂肪組織に局在する Treg (VAT-Treg) は、肥満に伴う慢性炎症を抑制することで全身の糖代謝恒常性維持に重要な役割を担う。VAT-Treg は、雄性では肥満に伴い減少する一方、雌性における変化は不明である。そこで本研究では、肥満マウスの代謝調節における雌雄差に関し、肥満に伴う VAT-Treg 局在変化の性差とその機序の解明を目的に研究を行った。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 実験動物

雌性および雄性 C57BL/6J マウスを Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan) より購入し、富山大学研究推進機構研究推進総合支援センター生命科学先端研究支援ユニット動物実験施設 (12 時間の明暗サイクル、 $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) にて飼育した。食餌および飲水は自由摂取させた。8 週齢の雌性マウスに卵巣摘出術 (OVX) もしくは偽手術を施し、0.1 mL/mouse の Ampicillin を腹腔内投与した。雌性偽手術マウスに通常食 (chow) または高脂肪食 (HFD) を給餌した F-Chow 群および F-HFD 群、OVX マウスに HFD を給餌した OVX-HFD 群、および OVX-HFD マウスにエストロゲン (E2) 補充を行った OVX-HFD+E2 群の計 4 群を設定した。雌性における術後の Ampicillin 投与の影響を避けるため、8 週齢の雄性マウスに 0.1 mL/mouse の Ampicillin を腹腔内投与した。雄性マウスは chow または HFD を給餌する M-Chow 群および M-HFD 群の計 2 群を設定した。マウスの性周期が約 4 日であることから、術後 (雄性は Ampicillin 投与後) 4 日目に E2 投与および高脂肪食負荷を開始した。また、通常食として CE-2 (Clea Japan Inc., Tokyo, Japan) を、高脂肪食として Rodent diet with 60 kcal % fat (Research Diets Inc., New Brunseick, NJ, USA) を給餌した。実験は富山大学動物実験取り扱い規定に基づき実施した。

## 第 2 項 エストロゲン補充

E2 溶液は、17 $\beta$ -estradiol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) を sesame oil に 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるよう溶解し、調整した。マウスの性周期を模倣し、マウスあたり E2 溶液 0.1 mL (1.5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を 4 日に 1 回皮下投与した。E2 投与濃度はラットに関する既報に基づき予試験を行い (Asarian et al., 2002)、体重推移などの代謝パラメーターを指標に設定した。性周期は膣スメアを Giemsa 染色することにより判定し (Meziane et al., 2007)、通常マウスの性周期が実際に約 4 日であることを確認した (Data not shown)。

## 第 3 項 糖・インスリン負荷試験

食餌負荷 12 週後に糖負荷試験 (GTT) および食餌負荷 15 週後にインスリン負荷試験 (ITT) を行った。GTT では 6 時間絶食ののちグルコース (2 g/kg body weight, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を腹腔内投与し、投与後 0, 15, 30, 60 および 120 分における血糖値を測定した。ITT では 2 時間絶食ののちヒトインスリン (0.75 U/kg body weight, Eli Lilly Japan., Kobe, Japan) を腹腔内投与し、投与後 0, 30, 60, 90 および 120 分後の血糖値を測定した。血糖測定には ACCU-CHECK<sup>®</sup> Aviva Nano (Roche DC Japan K.K., Tokyo, Japan) を使用した。

## 第 4 項 核磁気共鳴画像法による体組成の解析

食餌負荷 14 週後に第 2 章-第 2 節-第 3 項と同様に解析した。

## 第 5 項 小動物用代謝計測システムによるエネルギー代謝の計測

食餌負荷 16 週後に第 2 章-第 2 節-第 4 項と同様に解析した。

## 第 6 項 フローサイトメトリーによる細胞分析

脾臓をスライドガラスですり潰し、45  $\mu\text{m}$  のメッシュを通して 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1,500 rpm で 15 分間遠心した。上清を除去し溶血させ、脾細胞を得た。脾細胞と既報に基づき分取した SVF における Treg の割合を、FACS Aria II を用いて解析した (Sameshima et al.,

2015; Onogi et al., 2017)。Treg は 7AAD<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>細胞と定義した。染色に用いた抗体を Table 4 に示す。データは FACS Diva 6.1.2 (BD Bioscience) により解析した。

**Table 4** フローサイトメトリー抗体リスト

抗体	標識色素	希釈倍率	購入会社
CD45	PE-Cy7	1:400	eBioscience
CD8a	APC-Cy7	1:100	BD Bioscience
CD4	FITC	1:200	BD Bioscience
CD25	PE	1:40	BD Bioscience
Foxp3	APC	1:20	eBioscience
7AAD		1:100	eBioscience

## 第 7 項 Real-time PCR

既報に基づき、RNA 抽出、逆転写および SYBR green による real-time PCR を行った (Wada et al., 2010; Yonezawa et al., 2012)。各遺伝子の発現量は、18s ribosomal RNA で補正した。用いたプライマーの配列を Table 5 に示す。

## 第 8 項 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。one-way ANOVA および two-way ANOVA による分散分析および Bonferroni's test による多重検定比較を行った。 $P < 0.05$  を有意とした。

**Table 5** プライマー配列

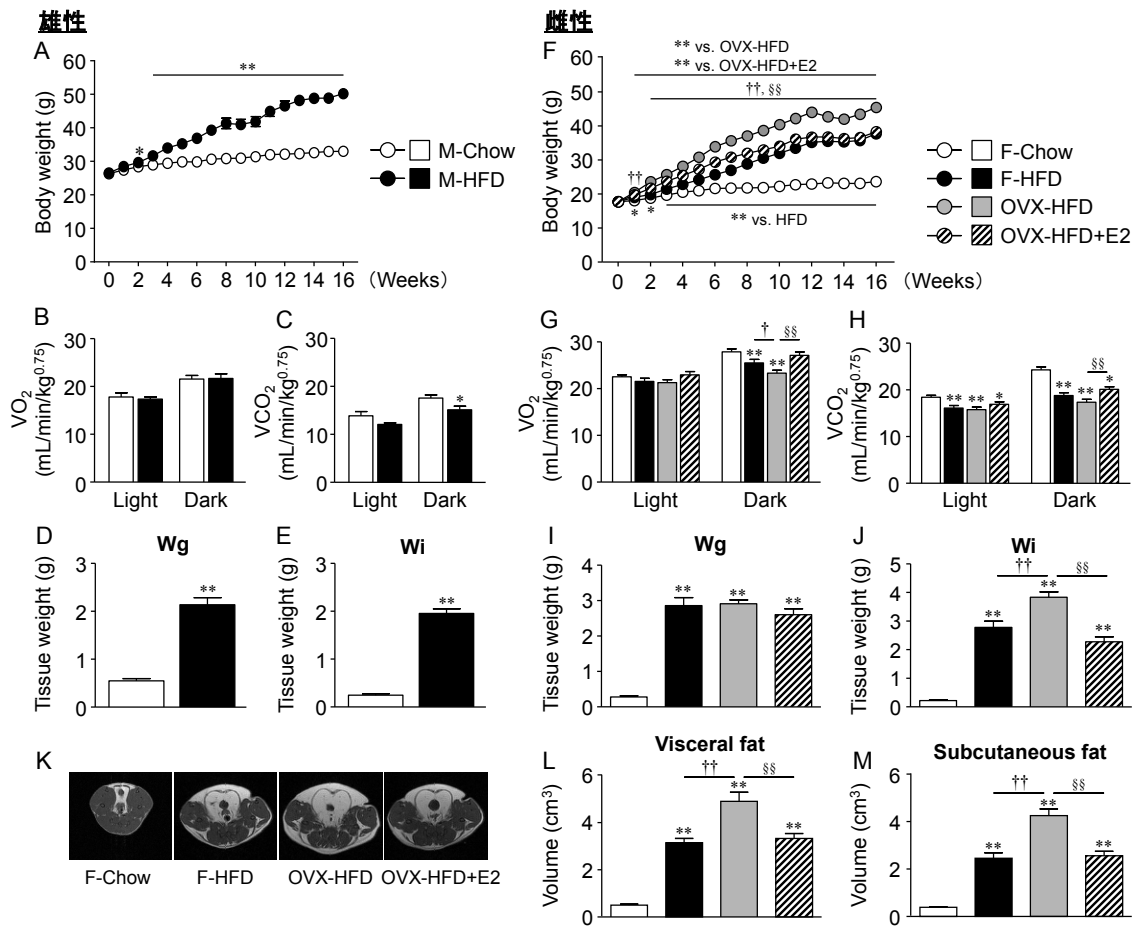
<b>Genes</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>Emr1</i>	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
<i>Itgax</i>	ATGTTGGTGGAAGCAAATGG	CCTGGGAATCCTATTGCAGA
<i>Tnfa</i>	AGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTTG
<i>Il33</i>	CCTGCCTCCCTGAGTACATAACA	CTTCTTCCCATCCACACCGT
<i>Il1b</i>	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
<i>Il1rl1</i>	GCAATTCTGACACTTCCCATG	ACGATTTACTGCCCTCCGTA
<i>Ccl2</i>	TCACCTGCTGCTACTCATTACCA	TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT
<i>Ccl3</i>	TGAAACCAGCAGCCTTTGCTC	AGGCATTCAGTTCAGGTCAGTG
<i>Ccl5</i>	CCTCACCATCATCCTCACTGCA	TCTTCTCTGGGTTGGCACACAC
<i>Ccl11</i>	TTCTATTCCCTGCTGCTCACGG	AGGGTGCATCTGTTGTTGGTG
<i>Ccl20</i>	CGACTGTTGCCTCTCGTACA	GAGGAGGTTACAGCCCTTT
<i>Ccl21</i>	TGAGCTATGTGCAAACCCTGAGGA	TGAGGGCTGTGTCTGTTCAAGTCT
<i>Ccl22</i>	TCTTGCTGTGGCAATTCAGA	GAGGGTGACGGATGTAGTCC
<i>Ccl24</i>	CTGTGACCATCCCCTCATCT	TATGTGCCTCTGAACCCACA
<i>Cxcl10</i>	TGCTGGGTCTGAGTGGGACT	CCCTATGGCCCTCATTCTCAC
<i>Ccr1</i>	TTAGCTTCCATGCCTGCCTTATA	TCCACTGCTTCAGGCTCTTGT
<i>Ccr2</i>	AGAGGTCTCGGTTGGGTTGT	CACTGTCTTTGAGGCTTGTTGC
<i>Ccr3</i>	TTTCCTGCAGTCCTCGCTAT	ATAAGACGGATGGCCTTGTG
<i>Ccr4</i>	CGAAGGTATCAAGGCATTTGGG	GTACACGTCCGTCATGGACTT
<i>Ccr5</i>	ATACCCGATCCACAGGAGAA	CCATTCCCTACTCCCAAGCTG
<i>Ccr6</i>	TTGTCCTCACCTACCGTTC	GATGAACCACACTGCCACAC
<i>Ccr7</i>	CCAGCAAGCAGCTCAACATT	GCCGATGAAGGCATACAAGA
<i>Cxcr3</i>	GCCAAGCCATGTACCTTGAG	GGAGAGGTGCTGTTTTCCAG
<i>18s rRNA</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

*Emr1*, EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1; *Itgax*, Integrin alpha-X; *Il33*, Interleukin 33; *Il1rl1*, Interleukin 1 receptor-like 1; *Ccl*, CC chemokine ligand; *Cxcl*, Chemokine (C-X-C motif) ligand; *Ccr*, CC chemokine receptor; *Cxcr*, Chemokine (C-X-C motif) receptor

### 第3節 結果

#### 第1項 食餌性肥満マウスの体重増加およびエネルギー代謝における雌雄差とエストロゲンの影響

高脂肪食負荷による全身の代謝への影響は雌雄で異なる (Amengual-Cladera et al., 2012)。したがって、まず各マウスの代謝表現系を検討した。雄性では、高脂肪食負荷により著明な体重増加および脂肪蓄積を認めた (Figure 10A, D, E)。エネルギー代謝を検討すると、酸素消費量 ( $VO_2$ ) には変化を認めなかったが、二酸化炭素排出量 ( $VCO_2$ ) は高脂肪食負荷により暗期において減少した (Figure 10B, C)。一方雌性では、高脂肪食負荷のみによる体重増加は雄性と比較し軽度であるが、OVX により著明な増加を認めた (Figure 10 F)。また、OVX-HFD マウスに対する E2 補充は、体重増加を F-HFD 群と同程度まで抑制した (Figure 10 F)。このとき、雌性マウスの  $VO_2$  および  $VCO_2$  は F-HFD 群において低下を認め、OVX-HFD 群ではさらなる  $VO_2$  の低下を認めた (Figure 10G, H)。また、OVX-HFD 群におけるこれらの基礎代謝の低下は、E2 補充により有意に改善した (Figure 10G, H)。解剖時の脂肪重量は、性腺周囲脂肪 (Wg) では高脂肪食を給餌した 3 群に差異を認めなかったが、鼠径部脂肪 (Wi) は体重変化に一致した蓄積を示した (Figure 10L, J)。一方、高脂肪食負荷 12 週目に MRI により脂肪蓄積を解析したところ、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織の蓄積はいずれも体重変化に一致し、OVX による著明な脂肪蓄積は E2 補充により F-HFD 群と同程度まで抑制された (Figure 10K-M)。したがって、高脂肪食負荷 16 週では Wg 蓄積量が限界を越えたため、F-HFD と OVX-HFD 間の差が消失したと考えられる。以上より、E2 は高脂肪負荷による体重増加、脂肪蓄積およびエネルギー代謝の低下に対して防御的に作用することが示された。

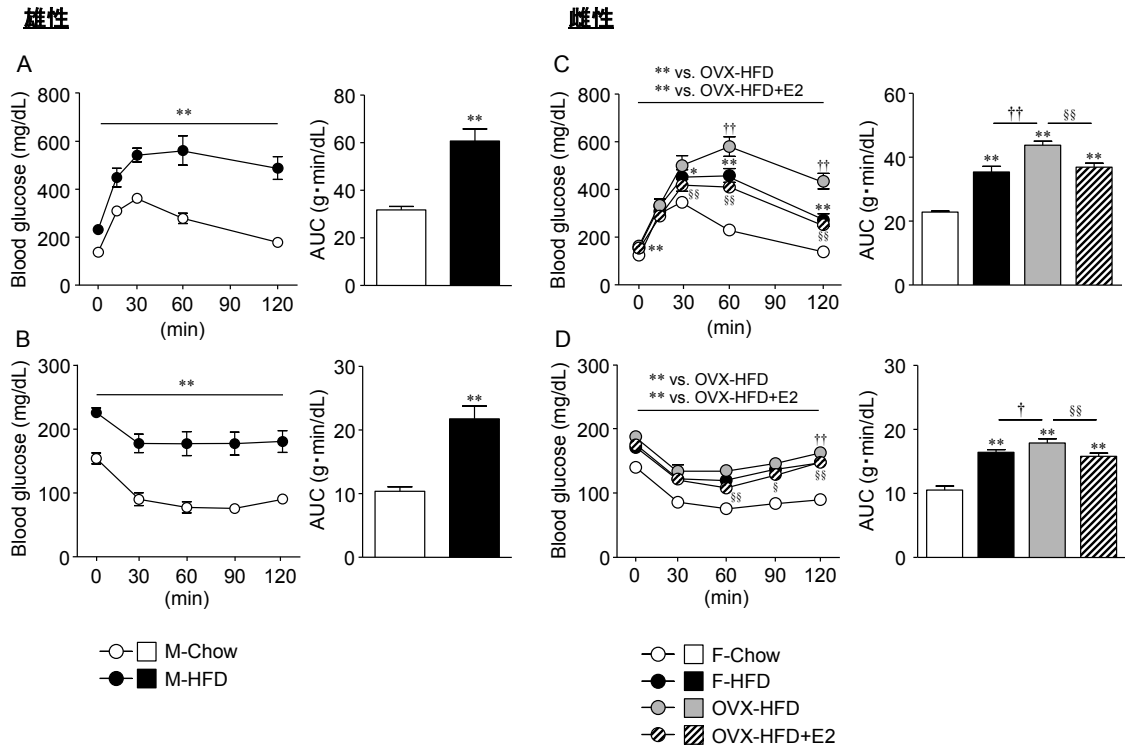


**Figure 10**

**Sex difference in metabolic phenotypes of diet-induced obesity.** Changes in body weight (A, F), oxygen consumption (B, G), carbon dioxide production (C, H), weights of gonadal (Wg) and inguinal white adipose tissue (Wi) (D, E, I, J) in male (A-E) and female mice (F-J) are shown. Representative T1-weighted axial MRI slices of female mice (K), and estimated volumes of visceral (L) and subcutaneous fat (M) in each experimental group of female mice are shown. Data are the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 10-18$  in A, F;  $n = 5-9$  in B-E, G-M). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from Chow mice; † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ , significantly different between F-HFD and OVX-HFD mice; § $P < 0.05$  and §§ $P < 0.01$ , significantly different between OVX-HFD and OVX-HFD+E2 mice.

## 第 2 項 食餌性肥満マウスの糖代謝における雌雄差とエストロゲンの影響

次に、高脂肪食負荷による糖代謝変化の雌雄差を検討するため、GTT および ITT を行った。雄性では、高脂肪食負荷により著明な耐糖能異常とインスリン感受性の悪化を認めた (Figure 11A, B)。一方雌性では、高脂肪食負荷に伴う糖代謝異常は軽度であったが、OVX-HFD では顕著に増悪し、E2 補充はこれを F-HFD 群と同程度まで改善させた (Figure 11C, D)。



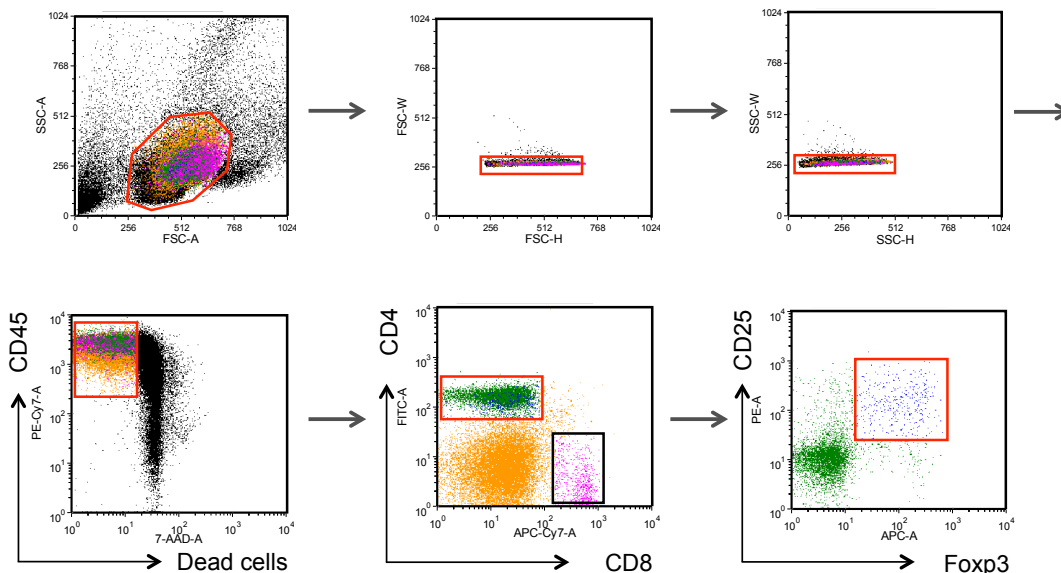
**Figure 11**

**Sex difference in glucose metabolism of diet-induced obesity.** Glucose tolerance test (A, C), insulin tolerance test (B, D), and glucose area under the curve (AUC) in male and female mice are shown. Data are the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 5-9$ ).  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$ , significantly different from control mice;  $\dagger P < 0.05$  and  $\dagger\dagger P < 0.01$ , significantly different between F-HFD and OVX-HFD mice;  $\S P < 0.05$  and  $\S\S P < 0.01$ , significantly different between OVX-HFD and OVX-HFD+E2 mice.



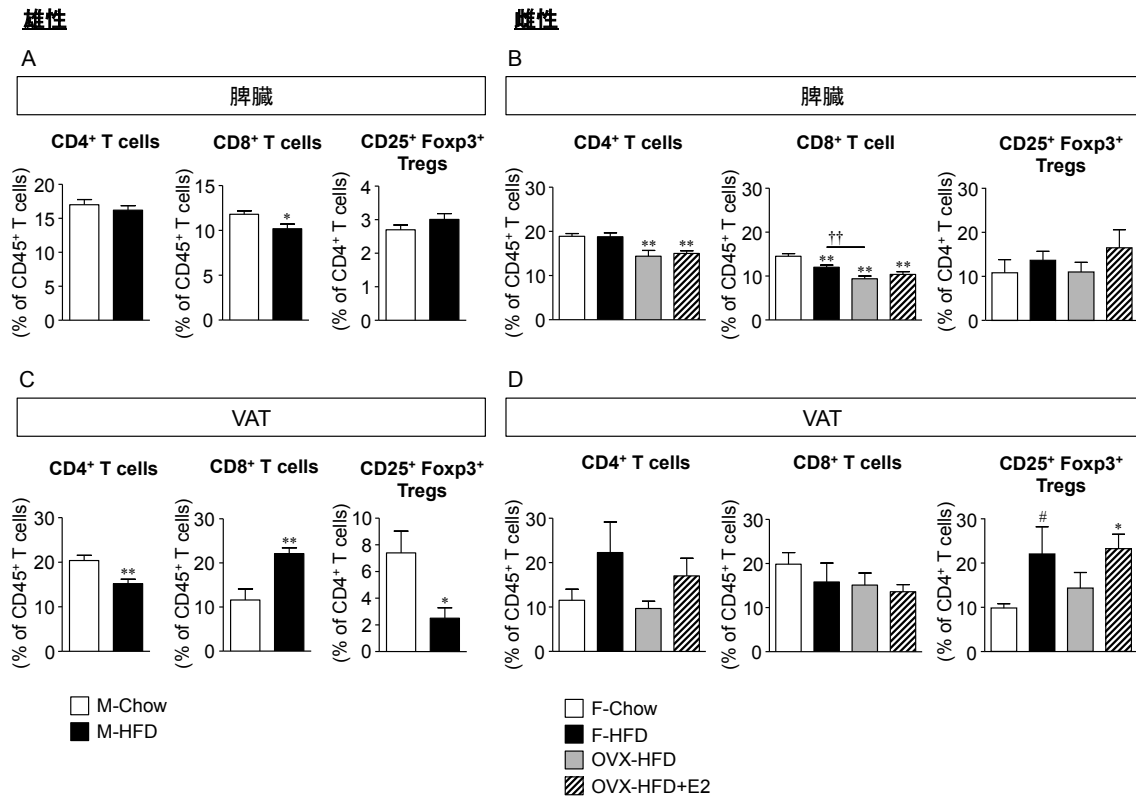
### 第 3 項 食餌性肥満マウスの VAT-Treg 局在の雌雄差とエストロゲンの影響

VAT-Treg は慢性炎症および糖代謝の調節に重要な役割を担う。雄性マウスでは肥満に伴い VAT-Treg が減少し、これが慢性炎症の亢進に寄与すると考えられている (Feuere et al., 2009)。しかし、雌性での肥満に伴う VAT-Treg の変化は不明である。そこで、全身性の免疫細胞を反映する脾臓、および VAT における Treg の割合をフローサイトメトリーを用いて検討した (Figure 12)。脾臓において、 $CD4^+$  T 細胞は雄性では変化を認めなかったが、雌性では OVX-HFD および OVX-HFD+E2 群で減少し、 $CD8^+$  T 細胞は雌雄ともに高脂肪食負荷により減少した (Figure 13A, B)。しかし、脾臓 Treg は雌雄ともに各群で変化を認めなかった (Figure 13A, B)。一方、VAT において雄性マウスでは既報に一致し (Feurer et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Winer et al, 2009)、高脂肪食負荷による  $CD4^+$  T 細胞の減少、 $CD8^+$  T 細胞の増加、および VAT-Treg の減少を認めた (Figure 13C)。雌性 VAT では、 $CD4^+$  T 細胞および  $CD8^+$  T 細胞の割合に有意な変化を認めなかった (Figure 13D)。興味深いことに、雌性では雄性とは逆に高脂肪食負荷により VAT-Treg の増加傾向を示した (Figure 13D)。この増加は OVX により消失し、E2 補充は F-HFD 群と同程度に VAT-Treg を増加させた (Figure 13D)。



**Figure 12**

**Gating strategy for  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg cells.** Representative flow cytometry plots showing the gating strategy for identifying Tregs.

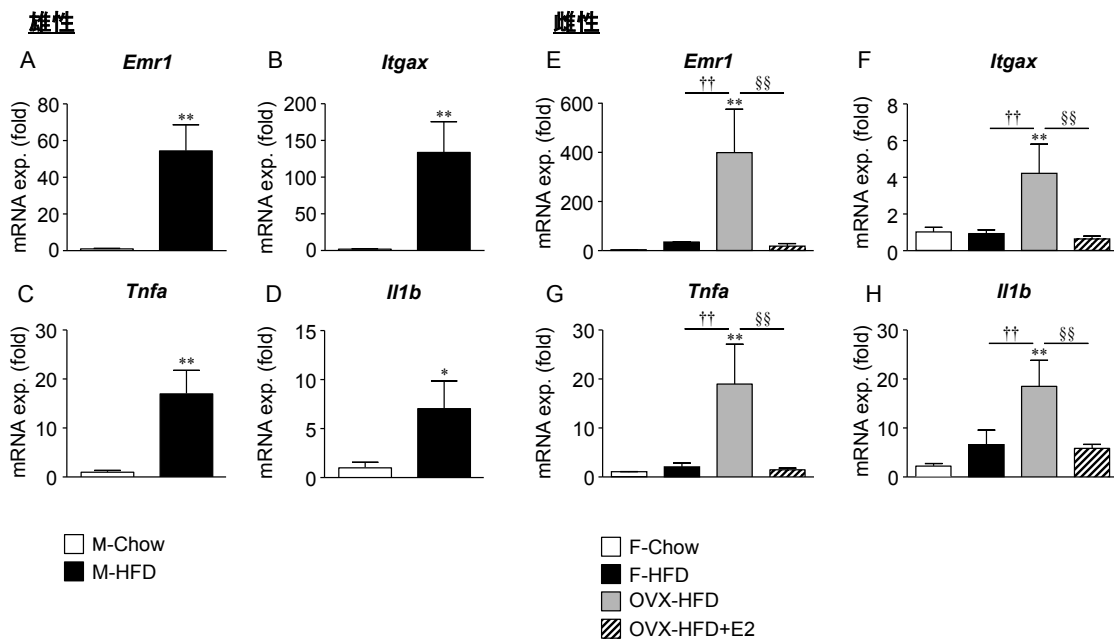


**Figure 13**

**Sex difference in the impact of HFD feeding on adipose tissue localization of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and Treg.** The ratios of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in CD45<sup>+</sup> cells, and CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg in CD4<sup>+</sup> cells of spleen (A, C) and gonadal white adipose tissue (B, D) of male and female mice examined by flow cytometry are shown. Data are the mean ± S.E. (Spleen, n = 5-9; Wg, n = 4-6). \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01, significantly different from control mice; #*P* < 0.1 compared with control mice.

#### 第4項 食餌性肥満マウスの脂肪組織慢性炎症における雌雄差とエストロゲンの影響

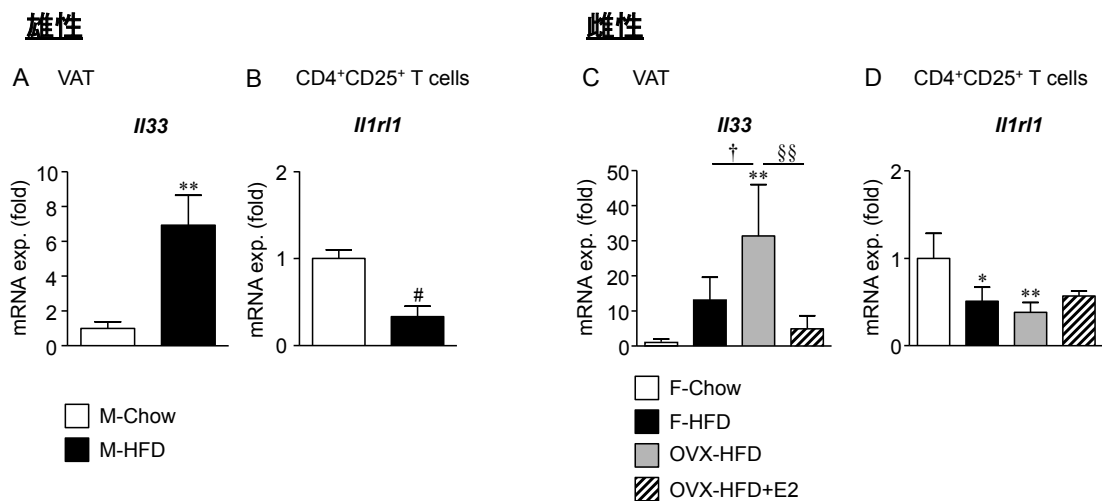
VAT-Treg の変動による脂肪組織慢性炎症の変化を検討するため、炎症関連遺伝子発現を解析した。総マクロファージマーカー *Emr1* (F4/80)、炎症性マクロファージマーカー *Itgax* (CD11c)、および炎症性サイトカイン *Tnfa* と *Il1b* は、M-HFD 群において顕著に増加した (Figure 14A-D)。一方雌性では、これら炎症関連遺伝子の発現は OVX-HFD 群においてのみ有意に増加した (Figure 14E-H)。VAT-Treg が増加した F-HFD および OVX-HFD+E2 ではこれらの発現増加を認めなかったことから (Figure 13D, 14E-H)、雌性では Treg を介した E2 作用が脂肪組織慢性炎症の抑制に寄与する可能性が考えられた。



**Figure 14**  
**Sex difference in the mRNA expression of inflammatory genes in gonadal white adipose tissues.** mRNA expression of *Emr1* (A, E), *Itgax* (B, F), *Tnfa* (C, G), and *Il1b* (D, F) in gonadal WAT of male and female mouse is shown. Data are the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 5-9$ ). \*\* $P < 0.01$ , significantly different from control mice; †† $P < 0.01$ , significantly different between F-HFD and OVX-HFD mice; §§ $P < 0.01$ , significantly different between OVX-HFD and OVX-HFD+E2 mice.

## 第 5 項 食餌性肥満マウスの脂肪組織 Treg における IL33/ST2 シグナル

雄性において、Interleukin 33 (IL33) はその受容体の ST2 (Interleukin 1 receptor-like 1; *Il1rl1*) を介して VAT-Treg の動員および維持に重要な役割を担う (Vasanthakumar et al., 2015; Kolodin et al., 2015)。したがって、VAT-Treg 局在の雌雄差における機序として IL33/ST2 シグナルに着目し、脂肪組織の *Il33* および脂肪組織から単離した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞における *Il1rl1* の遺伝子発現を解析した。IL33 は炎症などによる細胞傷害により分泌されることが知られている (Kolodin et al., 2015)。このことに一致して、*Il33* の発現は雌雄ともに肥満および脂肪組織の慢性炎症状態に相関して増加した (Figure 15A, C)。一方、雄性マウスでは肥満に伴い VAT-Treg の ST2 発現は減弱する報告と一致し (Vasanthakumar et al., 2015)、本検討においても M-HFD 群における *Il1rl1* の発現低下を認めた (Figure 15B)。さらに、雌性においても高脂肪食負荷による *Il1rl1* の発現低下を認めたことから、Figure 13D において認められた F-HFD および OVX-HFD+E2 群の VAT-Treg 増加には、IL33/ST2 シグナルとは異なる機構が存在することが示唆された (Figure 15D)。

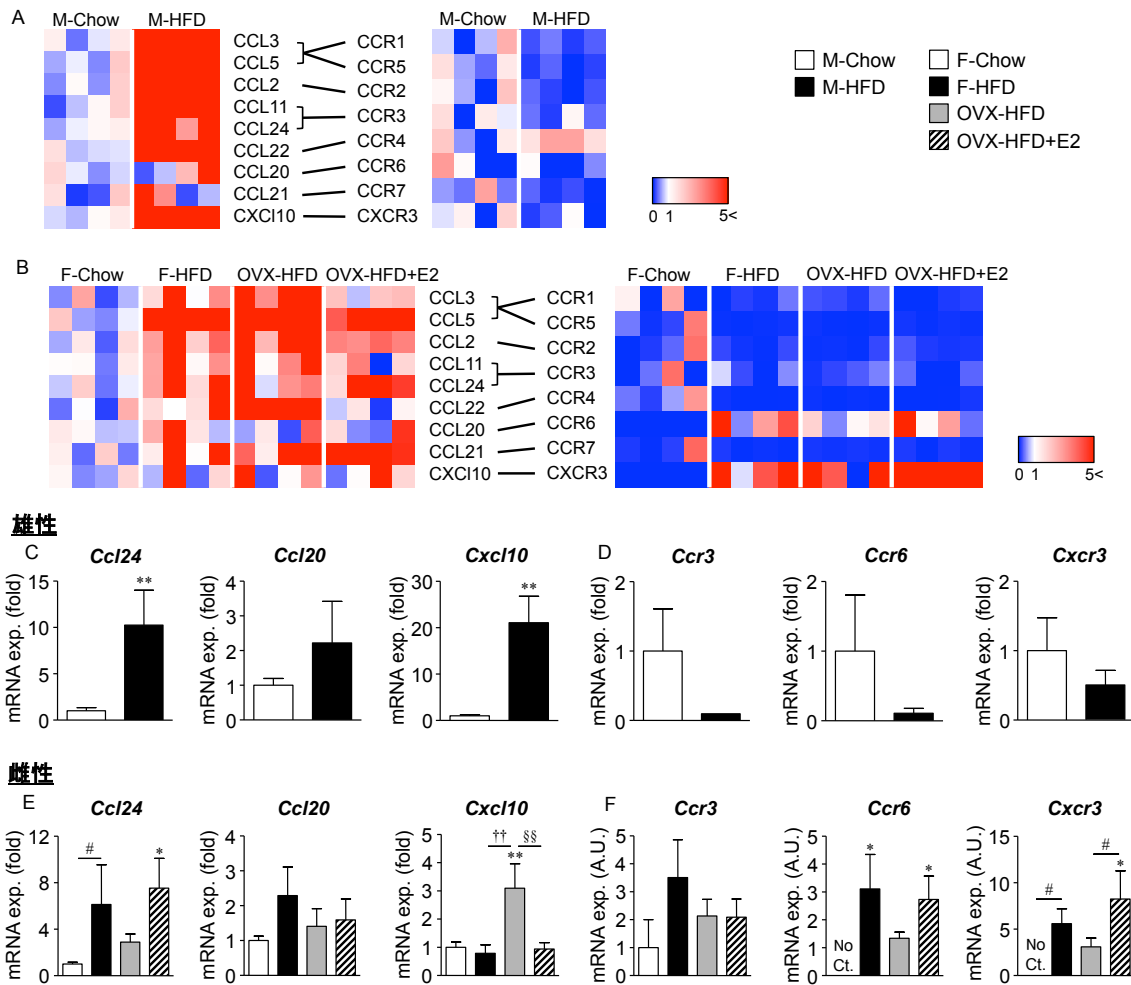


**Figure 15**

**Sex difference in the mRNA expression of IL33 in gonadal white adipose tissue and ST2 in adipose CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated from the Wg of male and female mice by FACS Aria cell sorter. mRNA expression of *Il33* in the Wg (A, C) and *Il1rl1* in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (B, D) is shown. Data are the mean ± S.E. ( $n = 5-9$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from Chow mice; # $P < 0.1$ , different from Chow mice; † $P < 0.05$ , significantly different between F-HFD and OVX-HFD mice; §§ $P < 0.01$ , significantly different between OVX-HFD and OVX-HFD+E2 mice.

## 第6項 脂肪組織のケモカイン発現および脂肪組織 Treg のケモカイン受容体発現における雌雄差とエストロゲンの影響

Figure 15 の成績により、肥満に伴う雌性 VAT-Treg の増加と IL33/ST2 シグナルの相関は認められなかった。また、脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞における増殖因子 *Ki67* の発現にも差異を認めなかった (Data not shown)。そこで次に、肥満に伴う VAT-Treg 局在変化における雌雄差の機序として、Treg の遊走に着目した。VAT-Treg は様々なケモカイン受容体を発現しており (Feuerer et al., 2009; Cipolletta et al., 2012)、Treg の組織への遊走における関与が示唆されるため、脂肪組織のケモカイン発現および脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞の対応するケモカイン受容体発現を検討した。ケモカインとその対応する受容体をヒートマップ上で線で結び示した (Figure 16A, B)。ヒートマップに示すように、雄性では高脂肪食負荷により多くの脂肪組織ケモカイン発現が増加し、脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞のケモカイン受容体発現は低下した (Figure 16A)。雌性においても、雄性同様に多くのケモカインの増加とケモカイン受容体の減少が認められた。脂肪組織 CCL24 および脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞の CCR6 と CXCR3 は、VAT-Treg が増加した F-HFD および OVX-HFD+E2 群において特に増加していた (Figure 16B)。そこで、雌性において特徴的に変化したケモカインシグナルに着目し、対応するリガンドまたは受容体発現を雌雄ともに例数を追加して検討した (Figure 16C-F)。雄性の脂肪組織では、CCL24 および CXCR3 のリガンド CXCL10 は増加し、CCR6 のリガンド CCL20 は有意差を認めないものの、増加する傾向を示した (Figure 16C)。雄性では高脂肪食負荷により VAT-Treg が減少したことから、VAT-Treg 変化にこれらケモカイン発現の増加は関連しないと考えられた。一方、脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞における CCL24 の受容体 CCR3、CCR6 および CXCR3 は減少傾向を示したが、有意な差を認めなかった (Figure 16D)。雌性では、脂肪組織 CCL24 および脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞における CCR6 と CXCR3 に VAT-Treg 局在と関連した変化を認めた (Figure 16E, F)。一方、これらに対応する受容体およびリガンド発現は、F-HFD および OVX-HFD+E2 群において変化しなかった (Figure 16E, F)。よって、脂肪組織の CCL24、脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞の CCR6 および CXCR3 の発現増加が、雌性での VAT-Treg の局在化に関与する可能性が考えられた (Figure 16E, F)。

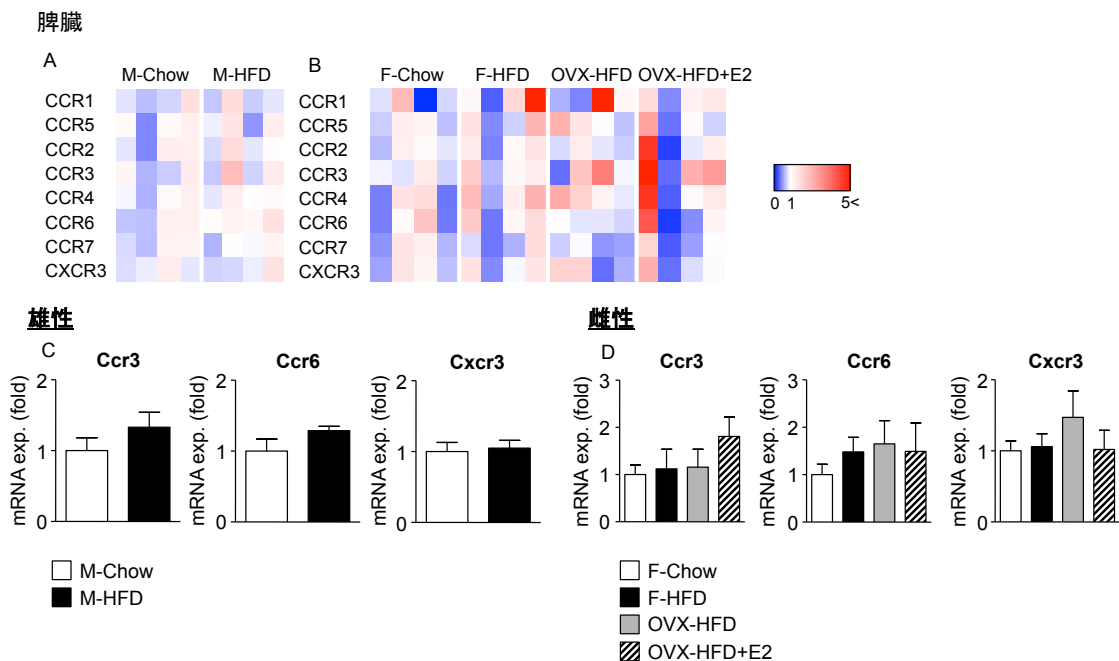


**Figure 16**

**Heat map of mRNA expression of chemokines in the Wg and their receptors in adipose CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated from the Wg of male (A, C, D) and female (B, E, F) mice by FACS Aria cell sorter. mRNA expression of chemokines in the Wg and their corresponding receptors in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells was analyzed by real-time PCR. Heat map analysis showing different gene expression pattern in males and females of each mouse group. Color from red to blue indicates high to low expression. mRNA expression of *Ccl24*, *Ccl20*, and *Cxcl10* in the Wg (C, E), and *Ccr3*, *Ccr6*, and *Cxcr3* in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (D, F) is shown. Data are the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 5-9$ ; C-F). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from Chow mice; # $P < 0.1$ , among two groups, as indicated; †† $P < 0.01$ , significantly different between F-HFD and OVX-HFD mice; §§ $P < 0.01$ , significantly different between OVX-HFD and OVX-HFD+E2 mice.

## 第7項 脾臓 Treg のケモカイン受容体発現における雌雄差とエストロゲンの影響

脾臓における Treg の割合は各群間に変化を認めなかった (Figure 13)。このことに一致して、脾臓におけるケモカイン発現および脾臓 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞におけるケモカイン受容体発現は、雌雄ともに有意な変化を認めなかった (Figure 17A-D)。したがって、肥満に伴う Treg およびケモカインシグナルの変化は、全身性ではなく脂肪組織局所的に生じると考えられた。



**Figure 17**

**Heat map of mRNA expression of chemokine receptors in splenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated from spleens of male (A, C) and female (B, D) mice by FACSARIA cell sorter. mRNA expression of chemokine receptors in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were analyzed by real-time PCR. Heat map analysis showing similar gene expression pattern in males and females of each mouse group. Color from red to blue indicates high to low expression. mRNA expression of *Ccr3*, *Ccr6*, and *Cxcr3* in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells is shown. Data are the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4-9$ ; C, D).

## 第4節 考察

女性の閉経期におけるエストロゲンの低下は、肥満および2型糖尿病のリスク増加に深く関連する (Karvonen-Gutierrez et al., 2016)。生理的なエストロゲンは様々な組織に作用してエネルギー代謝、インスリン感受性、脂質合成および慢性炎症を調節することで、代謝恒常性の維持を担う (D'Eon et al., 2005; Nagira et al., 2006; Xu et al., 2011; Yonezawa et al., 2012)。故に、雌性ではエストロゲン作用により、一般的に雄性と比較して肥満に伴う代謝障害の影響が小さいと考えられている。さらに、雄性では肥満に関連し VAT-Treg が減少することで慢性炎症がより亢進し、糖代謝異常を増悪させることが報告されている (Han et al., 2013)。しかし、雌性における VAT-Treg の局在変化、および機能に対するエストロゲンの影響は不明であった。本研究において、VAT-Treg 局在は肥満に伴い雄性では減少するのに対し、雌性では増加する雌雄差を明らかにした。また、雌性の食餌性肥満マウスにおける VAT-Treg の増加が卵巣摘出によるエストロゲンの枯渇により消失し、エストロゲン補充がこれを回復させたことから (Figure 13)、肥満病態での VAT-Treg 局在におけるエストロゲンの重要な役割が示唆された。さらに、CCL24、CCR6 および CXCR3 といったケモカイン関連分子発現が雌性特異的な VAT-Treg 変化と相関することを示し (Figure 16)、これらのケモカインシグナルが VAT-Treg 蓄積に関与する可能性を見出した。

雄性マウスでは VAT-Treg の局在における IL33/ST2 シグナルの重要性が報告されている (Kolodin et al., 2015; Vasanthakumar et al., 2015; Li et al., 2018)。本研究では既報に一致し、雄性マウスの脂肪組織では高脂肪食負荷により VAT-Treg 局在および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞中の ST2 発現の減少と、脂肪組織 IL33 の増加を認めた (Figure 15)。この高脂肪食負荷による ST2 発現の減少は、VAT-Treg が増加する F-HFD マウスの脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞においても認められた。したがって、雌性においては VAT-Treg の局在には IL33/ST2 以外の機構が関与すると考えられた。近年、VAT-Treg 局在に関する重要な因子として、内臓脂肪組織特異的な抗原を認識する T 細胞受容体 (TCR) の寄与が示唆されている。VAT-Treg に関連する TCR の過剰発現マウスを用いた検討において、雄性では VAT-Treg が増加するが、雌性ではこのような変化は認められなかった (Li et al., 2018)。このことから、雌性特異的な VAT-Treg 増加のメカニズムが存在することを示唆している。

内在性 Treg は胸腺で分化し、リンパ組織を主として全身に分布する。末梢組織へと分布した Treg は組織環境に応じてその恒常性維持を担う (Campbell et al., 2015)。組織常在性 Treg は組織特異的なケモカイン受容体の発現パターンを示し、各ケモカイン



シグナルによる組織への遊走に關与する (Wei et al., 2006)。脂肪組織における CCL24 および脂肪組織 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞における CCR6 と CXCR3 の発現は、雌性マウスの VAT-Treg の変化と一致した変動を示し (Figure 13)、これらのケモカインシグナルが VAT-Treg の動員に關与する可能性が考えられた。実際に、CCR6 欠損マウス由来の Treg では遊走能が減弱することが、*in vitro* の検討において示されている (Yamazaki et al., 2008)。さらに、CCR6 欠損マウスの骨髄を移植した実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデル Rag1 欠損マウスの中枢神経系においても、Treg 遊走能の減弱を認め、CCR6 が Treg の遊走に關与することが *in vivo* でも示されている (Yamazaki et al., 2008)。また、高脂肪食を負荷した雄性 CXCR3 欠損マウスの脂肪組織において FOXP3 発現が低下することが報告されている (Rocha et al., 2014)。CXCR3 は Treg の膺島への走化性に關与することが報告されており (Yamada et al., 2012)、CCR6 同様、CXCR3 もまた VAT-Treg の蓄積に關与する可能性が考えられる。本研究では、雌性特異的に高脂肪食負荷に伴う VAT-Treg の増加と、これに一致したケモカインシグナルの増強が認められた。このことに一致して、エストロゲンがリンパ芽球における CCR6 発現を増加することが報告されている (Ho et al., 2016)。しかし、Treg の VAT への動員に対するエストロゲンやケモカインシグナルに關した分子メカニズムは未だ不明であり、さらなる検討が必要である。本検討においては、ケモカインおよびその受容体をスクリーニングし、雌性 VAT-Treg 局在に關連したケモカインシグナルの候補を提示した。Treg におけるケモカイン受容体の発現変化に關しては、今後フローサイトメトリーを用いたより詳細かつ正確な検討が必要と考えられる。さらに、本研究において同定された候補シグナルに關し、今後欠損マウスまたは中和抗体等を用いた介入実験を行うことで、VAT-Treg の局在との密接な關連を解明する必要がある。

性ホルモンに調節される免疫細胞として、2 型自然リンパ球 (ILC2) が注目されている。男性ホルモンは ILC2 の分化および増殖を抑制し、ILC2 が発症に關与するアレルギー性気管支炎の罹患率は女性と比較し男性で低い (Cephus et al., 2017; Laffont et al., 2017)。実際に、喘息患者の血中 ILC2 数は女性と比較し男性で低値であることが示されている (Cephus et al., 2017)。近年、ILC2 が脂肪組織恒常性や *browning* に重要な役割を担うことが報告されている (Bénézech et al., 2019)。したがって、肥満に伴う代謝異常の性差に ILC2 が關与する可能性も考えられる。

マウスに対するエストロゲン補充は、一般に浸透圧ポンプまたは徐放性タブレットを用いて検討されてきた (D'Eon et al., 2005; Yonezawa et al., 2012; Torres et al., 2018)。一方、これらは性周期を考慮しておらず、生理的な投与ではない。齧歯類の性周期は約 4 日であり、ラットに対する生理的なエストロゲン補充として 4 日毎にエストラジオー

ルを 2  $\mu\text{g}$  皮下投与する方法が報告されている (Asarian et al., 2002)。しかし、この投与量に基づき検討したところ、マウスに対しては過剰量であり、コントロールと比較し著明な体重減少を認めた。スミアに基づく性周期日数、体脂肪蓄積、エネルギー代謝および糖代謝を指標に予試験を重ね、生理的なエストロゲン投与濃度をマウスあたり 1.5  $\mu\text{g}$  と決定した。実際に OVX-HFD マウスにおける代謝異常がエストロゲン投与により HFD マウスと同程度まで回復することを確認し (Figure 10, 11)、C57BL/6J マウスに対するエストロゲン補充モデルを確立した。

肥満病態のヒトにおける VAT-Treg 局在を検討した成績が複数報告されている。しかしこれらの中には、相反する結果も多い。その理由として、被験者の年齢、性別の割合、閉経率、および VAT-Treg 数の解析方法の相違などが関連すると考えられる (Winer et al., 2009; Eller et al., 2011; Zeyda et al., 2011; Travers et al., 2015; Becker et al., 2017; Zeng et al., 2018)。肥満病態における VAT-Treg の増加が報告された研究では、被験者の多くが女性であった (Zeyda et al., 2011; Wolowczuk et al., 2012)。このことに関連して、肥満マウスにおいても VAT-Treg 局在の性差が報告されたが、性差のメカニズムおよびエストロゲンの関与は不明なままであった (Pettersson et al., 2012)。本研究において、生理的なエストロゲン作用が VAT-Treg に深く影響することを明らかにした。一方、エストロゲンは Treg だけではなく全身に作用するため、本研究において得られた VAT-Treg 局在に対する作用は、エストロゲンが肥満に関連した代謝ストレスを軽減させたことも機序のひとつとして考えられる。

FOXP3 は、Treg の免疫抑制機能発現のために重要な転写因子である。したがって、Treg は一般に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T 細胞と定義される (Fontenot et al., 2015)。本研究では、フローサイトメトリーにおける FOXP3 の細胞内染色のため、細胞膜透過処理を行う前にパラホルムアルデヒドによる細胞膜固定を行った。しかし、パラホルムアルデヒド処理は mRNA 発現解析には適さないため (Do et al., 2014)、Treg におけるケモカイン受容体発現解析として脂肪組織および脾臓から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞を単離し、検討を行った (Figure 16, 17)。FOXP3 が同定される以前は、Treg は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞と定義されていたが (Poehlein et al., 2009)、近年、活性化 T 細胞もまた CD25 を発現することが報告されている (Ohkura et al., 2016)。したがって、FOXP3 レポーターマウスなどのパラホルムアルデヒドの影響を除いた条件下で FOXP3 陽性細胞を単離することで、より正確な遺伝子発現変化の解析が可能になると考えられる。

## 第 5 節 小括

本研究では、肥満病態における VAT-Treg の局在に性差があることを示した。雌性における食餌性肥満に伴う VAT-Treg の増加は、エストロゲンを介したケモカインシグナルにより誘導されることが示唆された。また、このことが雌性マウスにおける肥満に関連した慢性炎症および糖代謝異常からの防御機構の一因として重要であると考えられた。

## 第 5 章 総括

生体内の糖代謝恒常性維持には様々なステロイドホルモンの寄与が知られており、その破綻は糖尿病などの代謝障害を誘導する。肥満病態では、内臓脂肪組織を中心とする末梢組織での慢性炎症が代謝障害の基盤病態である。本研究では、はじめにステロイドホルモンであるアルドステロンの受容体 MR のマクロファージにおける機能を解明し、MR 阻害剤による慢性炎症抑制を標的とした新たな肥満病態改善機構を明らかにした。マクロファージにおける MR の発現自体は炎症により抑制されるが、その活性化は炎症性マクロファージへの極性化ではなく、サイトカイン産生の増強に寄与すると考えられた。特に、MR 阻害は NLRP3 インフラマソームの Signal 1 および 2 の両者を抑制することで、強力な IL1 $\beta$ 抑制作用を示すことが明らかとなった。本知見は、肥満糖尿病病態のみならず、NLRP3 インフラマソームが関連する自己免疫疾患、癌、神経変性などの多くの病態治療に対する MR 阻害の可能性を提示した。次に、肥満病態において内臓脂肪組織の慢性炎症に対する生理的な防御因子である Treg に対し、ステロイドホルモンであるエストロゲン作用の観点から検討し、網羅的なケモカイン発現プロファイル解析により VAT-Treg 局在における雌性特異的な局所ケモカインシグナルを見出した。今後、本検討におけるエストロゲンによる VAT-Treg 局在機構の全容が解明されることで、エストロゲンの Treg を介した炎症制御機構が明らかにされ、治療への応用が可能となることが期待される。

## 参考文献

厚生労働省、平成 28 年「国民健康・栄養調査」

厚生労働省、平成 29 年「国民健康・栄養調査」

Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. Sex differences in the effect of high-fat diet feeding on rat white adipose tissue mitochondrial function and insulin sensitivity. *Metabolism* 61: 1108-1117, 2012

Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF, Biguetti CC, Glowacki A, Yoshizawa S, et al. IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis. *J Bone Miner Res.* 30: 412-422, 2015

Armani A, Cinti F, Marzolla V, Morgan J, Cranston GA, Antelmi A, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *FASEB J.* 28: 3745-3757, 2014

Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav.* 42: 461-471, 2002

Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, et al. A nuclear receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol.* 19: 2466-2477, 2005

Becker M, Levings MK, Daniel C. Adipose-tissue regulatory T cells: Critical players in adipose-immune crosstalk. *Eur J Immunol.* 47: 1867-1874, 2017

Bénézech C, Jackson-Jones LH. ILC2 orchestration of local immune function in adipose tissue. *Front Immunol.* 10: 171, 2019

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11: 889-896, 2010

Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J.* 21: 2185-2194, 2007

Caprio M, Antelmi A, Chetrite G, Muscat A, Mammi C, Marzolla V, et al. Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology* 15: 113-125, 2011

Campbell DJ. Control of regulatory T cell migration, function, and homeostasis. *J Immunol.* 195: 2507-2513, 2015

Cephus JY, Stier MT, Fuseini H, Yung JA, Toki S, Bloodworth MH, et al. Testosterone attenuates group 2 innate lymphoid cell-mediated airway inflammation. *Cell Rep.* 21: 2487-2499, 2017

Chaudhry A, Rudensky AY. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *J Clin Invest.* 123: 939-944, 2013

Chow Z, Banerjee A, Hickey MJ. Controlling the fire—tissue-specific mechanisms of effector regulatory T-cell homing. *Immunol Cell Biol.* 93: 355-363, 2015

Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, et al. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486: 549-553, 2012

Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med.* 21: 248-255, 2015

Corry DB, Tuck ML. The effect of aldosterone on glucose metabolism. *Curr Hypertens Rep.* 5: 106-9, 2003

D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem.* 280: 35983-35991, 2005

Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 61: 64-71, 2015

Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320: 674-677, 2008

Eller K, Kirsch A, Wolf AM, Sopper S, Tagwerker A, Stanzl U, et al. Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes* 60: 2954-2962, 2019

Favre GA, Esnault VL, Van Obberghen E. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 308: E435-E449, 2015

Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 15: 930-939, 2009

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4: 330-336, 2003

Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58: 2574-2582, 2009

Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 16: 120-126, 2005

Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 117: 2253-2261. 2008

Han JM, Levings MK. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. *J Immunol.* 191: 527-532, 2013

Hirata A, Maeda N, Hiuge A, Hibuse T, Fujita K, Okada T, et al. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc Res.* 84: 164-172, 2009

Ho MF, Bongartz T, Liu M, Kalari KR, Goss PE, Shepherd LE, et al. Estrogen, SNP-dependent chemokine expression and selective estrogen receptor modulator regulation. *Mol Endocrinol.* 30: 382-398, 2016

Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Okamoto N, Watanabe Y, Tsuneyama K, et al. Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. *J Leukoc Biol.* 96: 1087-1100, 2014

Ichihara Y, Wada T, Soeda Y, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, et al. SH2-Containing Inositol 5'-phosphatase 2 selectively impairs hypothalamic insulin signalling and regulation of food intake in mice. *J Neuroendocrinol.* 25: 372-382, 2013

Iwanami J, Mogi M, Okamoto S, Gao XY, Li JM, Min LJ, et al. Pretreatment with eplerenone reduces stroke volume in mouse middle cerebral artery occlusion model. *Eur J Pharmacol.* 566: 153-159, 2007



Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Taniguchi S, Takahashi M, Kashihara N. Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. *FASEB J.* 29: 3899-3910, 2015

Karvonen-Gutierrez CA, Park SK, Kim C. Diabetes and menopause. *Curr Diab Rep.* 16: 20, 2016

Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 16: 626-638, 2016

Kolodin D, van Panhuys N, Li C, Magnuson AM, Cipolletta D, Miller CM, et al. Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell Metab.* 21: 543-557, 2015

Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol.* 12: 15-28, 2016

Laffont S, Blanquart E, Savignac M, Cénac C, Laverny G, Metzger D, et al. Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med.* 214: 1581-1592, 2017

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 13: 397-411, 2013

Li C, DiSpirito JR, Zemmour D, Spallanzani RG, Kuswanto W, Benoist C, et al. TCR transgenic mice reveal stepwise, multi-site acquisition of the distinctive fat-Treg phenotype. *Cell* 174: 285-299, 2018

Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 110: 851-860, 2002

Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, et al. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in post menopausal women: results from the women's health initiative hormone trial. *Diabetologia* 47: 1175-1187, 2004

Marzolla V, Armani A, Zennaro MC, Cinti F, Mammi C, Fabbri A, et al. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 350: 281-288, 2012

Mazziotti G, Gazzaruso C, Giustina A. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends Endocrinol Metab.* 22: 499-506, 2011

Menéndez E, Valdés S, Botasa P, Delgado E, Abello N. Glucose tolerance and plasma testosterone concentrations in men. Results of the Asturias Study. *Endocrinol Nutr.* 58: 3-8, 2011

Meziane H, Ouagazzal AM, Aubert L, Wietrzyk M, Krezel W. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav.* 6: 192-200, 2007

Nagira K, Sasaoka T, Wada T, Fukui K, Ikubo M, Hori S, et al. Altered subcellular distribution of estrogen receptor  $\alpha$  is implicated in estradiol-induced dual regulation of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 147: 1020-1028, 2006

Nishioka T, Suzuki M, Onishi K, Takakura N, Inada H, Yoshida T, et al. Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II-induced hypertensive mouse: involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49: 261-268, 2007

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 15: 914-920, 2009

Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122: 707-721, 2005

Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38: 414-423, 2013

Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez JR. Angiotensin 2 and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 302: 128-139, 2009

Onogi Y, Wada T, Kamiya C, Inata K, Matsuzawa T, Inaba Y, et al. PDGFR $\beta$  regulates adipose tissue expansion and glucose metabolism via vascular remodeling in diet-induced obesity. *Diabetes* 66: 1008-1021, 2017

Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 402: 113-119, 2015

Pettersson US, Waldén TB, Carlsson PO, Jansson L, Phillipson M. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLoS One* 7: e46057, 2012

Pisani DF, Beranger GE, Corinus A, Giroud M, Ghandour RA, Altirriba J, et al. The K<sup>+</sup> channel TASK1 modulates beta-adrenergic response in brown adipose tissue through the mineralocorticoid receptor pathway. *FASEB J.* 30: 909-922, 2016

Poehlein CH, Haley DP, Walker EB, Fox BA. Depletion of tumor-induced Treg prior to reconstitution rescues enhanced priming of tumor-specific, therapeutic effector T cells in lymphopenic hosts. *Eur J Immunol.* 39: 3121-3133, 2009

Polanczyk MJ, Hopke C, Huan J, Vandenbark AA, Offner H. Enhanced FoxP3 expression and Treg cell function in pregnant and estrogen-treated mice. *J Neuroimmunol.* 170: 85-92, 2005

Ribas V, Drew BG, Le JA, Soleymani T, Daraei P, Sitz D, et al. Myeloid-specific estrogen receptor alpha deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 16457-16462, 2011

Rocha VZ, Folco EJ, Ozdemir C, Sheikine Y, Christen T, Sukhova GK, et al. CXCR3 controls T-cell accumulation in fat inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34: 1374-1381, 2014

Sameshima A, Wada T, Ito T, Kashimura A, Sawakawa K, Yonezawa R, et al. Teneligliptin improves metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *J Endocrinol.* 227: 25-36, 2015

Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 12: 593-605, 2010

Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 15324-15329, 2011

Schiller NK, Black AS, Bradshaw GP, Bonnet DJ, Curtiss LK. Participation of macrophages in atherosclerotic lesion morphology in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *J Lipid Res.* 45: 1398-1409, 2004

Torres MJ, Kew KA, Ryan TE, Pennington ER, Lin CT, Buddo KA, et al. 17 $\beta$ -estradiol directly lowers mitochondrial membrane microviscosity and improves bioenergetic function in skeletal muscle. *Cell Metab.* 27: 167-179, 2018

Travers RL, Motta AC, Betts JA, Bouloumié A, Thompson D. The impact of adiposity on adipose tissue-resident lymphocyte activation in humans. *Int J Obes.* 39: 762-769, 2015

Urbanet R, Nguyen DCA, Feraco A, Venteclef N, El Mogrhabi S, Sierra- Ramos C, et al. Adipocyte mineralocorticoid receptor activation leads to metabolic syndrome and induction of prostaglandin D2 synthase. *Hypertension* 66: 149-157, 2015

Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest.* 120: 3350-3364, 2010

Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 17: 179-188, 2011

Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Med.* 16: 276-285, 2015

Wada T, Ishikawa A, Watanabe E, Nakamura Y, Aruga Y, Hasegawa H, et al. Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J Endocrinol.* 235: 179-191, 2017

Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, et al. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high- fructose diet. *Endocrinology* 151: 2040-2049, 2010

Wada T, Miyashita Y, Sasaki M, Aruga Y, Nakamura Y, Ishii Y, et al. Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic syndrome with NASH in liver-specific SREBP-1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 305: E1415-E1425, 2013

Wada T, Ohshima S, Fujisawa E, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Aldosterone inhibits insulin -induced glucose uptake by degradation of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS2 via a reactive oxygen species-mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 150: 1662-1669, 2009

Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108: 426-431, 2006

Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 15: 921-929, 2009

Wolowczuk I, Hennart B, Leloire A, Bessede A, Soichot M, Taront S, et al. Poulain-Godefroy, Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 303: R135-R143, 2012

Xu Y, Nedungadi TP, Zhu L, Sobhani N, Irani BG, Davis KE, et al. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab.* 14: 453-465, 2011

Yamada Y, Okubo Y, Shimada A, Oikawa Y, Yamada S, Narumi S, et al. Acceleration of diabetes development in CXC chemokine receptor 3 (CXCR3)-deficient NOD mice. *Diabetologia* 55: 2238-2245, 2012

Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol.* 181: 8391-8491, 2008

Yonezawa R, Wada T, Matsumoto N, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, et al. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in

ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303: E445-E456, 2012

Zeng Q, Sun X, Xiao L, Xie Z, Bettini M, Deng T. A unique population: adipose-resident regulatory T cells. *Front Immunol.* 9: 2075, 2018

Zeyda M, Huber J, Prager G, Stulnig TM. Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity* 19: 743-748, 2011

Zhang YY, Li C, Yao GF, Du LJ, Liu Y, Zheng XJ, et al. Deletion of macrophage mineralocorticoid receptor protects hepatic steatosis and insulin resistance through ERa/HGF/Met pathway. *Diabetes* 66: 1535-1547, 2017

## 謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 病態制御薬理学研究室教授 笹岡利安 医学博士、准教授 恒枝宏史 薬学博士および講師 和田努 医学博士に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、適切なお指導、ご助言を頂戴しました富山大学大学院医学薬学教育部 産科婦人科学講座教授（現 富山大学長）齋藤滋 医学博士に厚く御礼申し上げます。

本研究において、NLRP3 インフラマソーム解析に関する適切なお指導、ご助言を頂戴しました富山大学大学院医学薬学研究部 免疫バイオ・創薬探索研究講座客員教授（現 富山県総合研究開発センター所長）高津聖志 医学博士、客員教授（現 富山県立大学工学部医薬品工学科 バイオ医薬品工学講座教授）長井良憲 医学博士、協力研究員（現 富山県総合研究開発センター主任研究員）本田裕恵 医学博士に深い感謝の意を表します。

本研究において、組織学的解析に関するご指導、ご尽力を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 病態病理学講座教授 笹原正清 医学博士、准教授 石井陽子 医学博士 および技官 松島貴子様 に深い感謝の意を表します。

本研究において、終始適切なお指導、ご尽力を賜りました富山大学大学院医学薬学教育部 産科婦人科学講座 鮫島梓 医学博士、田中智子 医学博士、および医学薬学教育部 病態制御薬理学研究室 小野木康弘 薬学博士に深く感謝申し上げます。

本研究において、多大なるご尽力を賜りました富山大学大学院医学薬学教育部 病態制御薬理学研究室 中村勇斗 薬学博士、渡邊愛理 薬学修士、長谷川颯 薬学修士、伊藤哲生 薬学修士、有賀裕輔 薬学士、西村燦志朗 薬学士に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、多大なるご協力を賜りました病態制御薬理学研究室の皆様 に心から感謝申し上げます。

2020年6月