

氏名 いしかわ あかり
石川 明香里

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 350 号

学位授与年月日 令和 2 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 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

学位論文題目 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
(The mechanisms of immune cell regulation by steroid hormones
in the development of obesity-associated chronic inflammation.)

論文審査委員

(主査) 教授 宗 孝紀
(副査) 教授 櫻井 宏明
(副査) 教授 笹岡 利安 (指導教員)

う。そこで次に、Ep による M ϕ 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 β 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 β 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 κ 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 β 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 β 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 ϕ 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²

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⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺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⁺CD25⁺ 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[®]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, 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

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	石 川 明 香 里
審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授	氏 名 宗 孝 紀 櫻 井 宏 明 笹 岡 利 安	
(論文題目) 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 (The mechanisms of immune cell regulation by steroid hormones in the development of obesity-associated chronic inflammation)		(判定) 合 格	
(論文審査の要旨) (2頁以内) ステロイドホルモンのひとつであるアルドステロンは、鉱質コルチコイド受容体 (MR) を介して 2 型糖尿病の病態基盤であるインスリン抵抗性を誘導することが知られている。その進展に脂肪組織の慢性炎症が深く関わり、MR 阻害薬エプレレノン (Ep) は肥満マウスの糖代謝を改善する。本研究では、慢性炎症に寄与する主要細胞であるマクロファージ (Mφ) の MR に着目し、Ep による糖代謝改善機構を探求した。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、閉経肥満マウスに対して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追求め、以下の新知見を得た。 1. 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^[1] 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 Mφ 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、その機序として、内臓脂肪組織 (eWAT) における炎症性 M1-Mφ 増加と抗炎症性 M2-Mφ 減少を改善した。さらに、肥満に伴い主に M1-Mφ 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 IL1β の産生を、Ep 投与は抑制した。IL1β 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、Ep による Mφ 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 IL1β の前駆体 proIL1β 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、IL1β 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、Ep は NLRP3 インフラマソーム活性化に必要な Signal 1, 2 の両機構を制御し、その機序として Ep は骨髄由来 Mφ 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、Mφ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解明した。

2. 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^[2]

肥満病態において、雌性では脂肪組織の慢性炎症の抑制に関わる Treg (VAT-Treg) の変化は不明なため、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 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。VAT-Treg の割合は、雄性では HFD 負荷により減少したのに対し、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た。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、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を示した。

結 論

本研究により、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明らかにした。また、高血圧症を合併した糖尿病患者での MR 阻害薬による治療効果の有用性を示した。さらに、女性更年期における肥満および糖尿病の発症に、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が関与することを見出した。

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。そこで、2型糖尿病領域において免疫系の制御による治療法の開発に際して、本研究成果は、標的とした免疫関連シグナルへの介入による新規治療戦略としての重要性を提示した。

主査および副査は、申請者 石川明香里 氏に面接を行うとともに論文内容を審査し、博士(薬科学)の学位を授与するに値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名, 論文題目, 掲載誌名, 巻, 最初の頁と最後の頁, 年を記載)

- 1) Wada T, Ishikawa A, Watanabe E, Nakamura Y, Aruga Y, Hasegawa H, Onogi Y, Honda H, Nagai Y, Takatsu K, Ishii Y, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Eplerenone prevented obesity-induced inflammasome activation and glucose intolerance. *J Endocrinol.* 235: 179-191, 2017.
- 2) Ishikawa A, Wada T, Nishimura S, Ito T, Okekawa A, Onogi Y, Watanabe E, Sameshima A, Tanaka T, Tsuneki H, Saito S, Sasaoka T. Estrogen regulates sex-specific localization of regulatory T cells in adipose tissue of obese female mice. *PLoS One.* 15(4): e0230885, 2020.