

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592740

研究課題名(和文)ヘルパーT細胞の異常が引き起こす肥満の病態解析

研究課題名(英文)Pathological analysis of helper T cell abnormality induced obesity

研究代表者

大西 智和(Ohnishi, Tomokazu)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30244247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：DUSP16のドミナントネガティブをT細胞特異的に発現させたマウスであるMKP-M CSマウスを作成したところ、ヘルパーT細胞の機能に異常が認められた。さらに、このマウスは摂食過多による体重上昇が認められた。そこで、視床下部の神経ペプチドの発現を調べたところ、摂食時に摂食刺激性のNPYの減少が少ないことが判明した。次に、小腸が分泌し満腹シグナルであるコレシストキニン(CCK)の発現を検討したところ、摂食時における発現が少ないことが判明した。これらのことから、MKP-M CSマウスでは摂食時に、CCKが少なくなり、視床下部のNPYの発現が減少しないため多く摂食し体重増加が起こることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously prepared MKP-M CS mice, which specifically express dominant negative DUSP16 in T cells. These mice had abnormality in helper T cell functions. We observed that MKP-M CS mice increased in food intake to obtain high body mass. Therefore, we analyzed expressions of various neuropeptides in their hypothalamus. We found that MKP-M CS mice decreased a reduction of expression of NPY, which stimulates feeding, during food feeding. Next, we detected expression of cholecystokinin (CCK), which is a satiety signal peptide, in small intestine. We found that T cell specific DUSP16 dominant negative decreased CCK expression in intestine of MKP-M CS mice during feeding. In summary, MKP-M mice increased inhibition on CCK expression in small intestine and reduction of NPY in hypothalamus to increase in body mass and food intake during feeding.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：JNK DUSP T細胞 肥満 NPY コレシストキニン

1. 研究開始当初の背景

T 細胞における JNK 特異的フォスファターゼ (MKP-M) の発現

末梢血リンパ球の 70%以上を占める T 細胞は、B 細胞や自分自身である T 細胞を活性化する作用のあるヘルパー T (Th) 細胞や、ウイルス感染細胞などを破壊する細胞障害性 T 細胞 (キラー T 細胞) などに分類される。Th 細胞は免疫応答を促進するためのサイトカインを分泌するコマンドセンターの働きを示す。その Th 細胞の分化に深く関わるシグナル伝達物は様々な分子が関わっているがその一つに c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1/2 がある。JNK1/2 の抑制物質やその遺伝子改変は、Th 細胞の分化を抑制するためインターフェロン (IFN-) などの Th1 サイトカインやインターロイキン 4 (IL-4) などの Th2 サイトカインの発現を抑えることが報告されている。

これまでに、マクロファージから新しいチロシン残基及びセリン/スレオニン残基のリン酸基を脱リン酸化する Dual-specificity phosphatase 16 (DUSP16) / MAP kinase phosphatase-macrophage (MKP-M) を同定し、DUSP16 は JNK を特異的に脱リン酸化し不活化することを明らかにした。そして、DUSP16 は T 細胞にも存在し、ナイーブな T 細胞が Th 細胞に分化するに従ってその発現が上昇することを明らかにした。Th 細胞の分化には JNK 活性が必要であることが知られているので、『MKP-M は過剰な JNK の活性を Th 細胞に分化させるために最適化する役割を持つ』という仮説を立てた。

DUSP16 ドミナントネガティブ T 細胞特異的発現マウス (MKP-M CS マウス)

DUSP16 遺伝子を同定し、得られた DUSP16 遺伝子を組み換え操作によりフォスファターゼの触媒活性部位である 244 番目の Cys を Ser に置換させた DUSP16 CS をコードする遺伝子を得た。この変異型 DUSP16 (MKP-M CS) はドミナントネガティブ活性を持ち、MKP-M CS を強制発現させた細胞では JNK の脱リン酸化が抑えられ、JNK 活性が強まることを明らかにした。次に、MKP-M が T 細胞分化に果たす役割を検討するため、T 細胞の特異的マーカーである Lck のプロモーターの下流に MKP-M CS 遺伝子を組み入れ、受精卵前核に注入し、MKP-M CS を T

リンパ球特異的に発現するトランスジェニックマウス (MKP-M CS マウス) を作成した。このマウスは、T 細胞特異的に MKP-M CS を発現したため、Th 細胞の比率が少なくなりさらに Th サイトカインである IL-12 などの血中濃度の異常を示した。この結果は、『Th 細胞分化のための JNK 活性の最適化に DUSP16 が必要』という仮説とは矛盾しない。

2. 研究の目的

近年、メタボリックシンドロームが免疫系に与える影響について多くの報告がなされている。例えば、脂肪細胞が分泌するいくつかのサイトカインが Th 細胞の活性化することが報告されている。しかし、逆に Th 細胞の異常が肥満を引き起こす例については未だ報告がなく、免疫系の異常がメタボリックシンドロームにどのように影響があるか不明である。

そこで、T 細胞に特異的に DUSP16 のドミナントネガティブを発現させ T 細胞の JNK 活性が上昇している MKP-M CS マウスを飼育し体重の変化を観察した。その結果、MKP-M CS マウスは授乳期までは正常の体重であったが、離乳期以降に多食や多飲によるとみられる体重の異常な増加が認められた。そして、この肥満マウスでは脂肪組織が異常に増加していることが分かった。MKP-M CS マウスの肥満は食欲の上昇が原因であると考えられるので、Th 細胞が摂食中枢である視床下部に作用し肥満を起こすメカニズムを調べるため、以下の 3 つの可能性を探る。

A. 脂肪組織を介する経路: 脂肪から分泌され血液脳関門を通り視床下部弓状核に働く食欲制御因子としてレプチンがある。また、活性化された Th 細胞や制御性 T 細胞は脂肪組織中のマクロファージを介して、脂肪細胞に作用することが知られている。そこで、MKP-M CS マウスの T 細胞分化異常に伴う Th 細胞の減少やサイトカインの分泌の異常が脂肪細胞においてレプチンの発現を抑制し、食欲を増強している可能性を探る。

B. 胃・小腸を介する経路: 摂食活動を制御する因子として、胃体部から分泌されるグレリンと、十二指腸・空腸から分泌されるコレシストキニン (CCK) がある。グレリンは食欲を増進し CCK は食欲を制御する

働きを持ち、共に迷走神経求心性ニューロンを介し延髄孤束核経路で視床下部に働く。一般に消化管上皮は細菌と接しており菌体成分を通すので、消化管の Th 細胞はその菌体成分と反応することで活性化する。MKP-M CS マウスが離乳後異常な体重増加が見られることから、離乳による胃や小腸の細菌の変化が MKP-M CS マウスの Th 細胞の作用を変化させ、胃からのグレリン分泌を増強させ又は腸からの CCK 分泌を低下させることで食欲を増す可能性を探る。

C.脳室周囲組織を介する経路: 免疫担当細胞が分泌するサイトカインが血液脳関門のない第3脳室周囲組織を経由して直接及び間接的に中枢神経に影響を及ぼし、発熱や抑鬱作用、交感神経系の興奮などの作用及ぼすことが知られている。よって、MKP-M CS マウスの Th 細胞が異常なサイトカインの分泌を起こし、脳室周囲組織を刺激することで視床下部に作用する経路を探る。

3. 研究の方法

MKP-M CS マウスの詳細な基礎的なデータを詳細に得るため、メタボリックケージを用い、食餌量、飲水量、尿量、体重を測定し、摂食と体重変化、飲料水と尿量の間関係を離乳後から観察し、野生型マウス(C57BL/6)との比較によって確かめる。MKP-M CS マウスと野生型マウスの食餌量からくる体重差の最も多い週齢を探り出した。

食餌量からくる体重差の最も多い週齢の MKP-M CS マウスを用い、もっとも可能性が高いと考えられる A)脂肪組織を介する経路について脂肪組織からのシグナルと視床下部における摂食制御ペプチドについて調べた。

(A) 脂肪組織を介する経路

1) 脂肪組織が分泌し食物摂取を制御する因子としてレプチンが上げられるので、この因子に注目する。レプチンはサーカディアンリズムによってその血中濃度が変化することが知られている。よって、レプチン発現の日内変動を調べ MKP-M CS マウスと野生型マウスで比較を行う。脂肪組織における発現は mRNA レベルでも制御されているので、脂肪組織を MKP-M CS マウスと野生型マウスから採取し、RNA を抽出した

後、リアルタイム RT-PCR 法によりレプチン mRNA レベルを比較した。

- 2) 脂肪組織にどのようなシグナルが入っているか予想するため、界面活性剤を含んだ緩衝液にてタンパクを抽出し、ウェスタンブロットによりシグナル分子の活性化を検討した。
- 3) 視床下部における摂食制御ペプチドの mRNA 検出しレプチンに対する血液脳関門は弓状核のある正中隆起のあたりには存在していないので、レプチンは弓状核のニューロンに働きそして室傍核と視床下部外側野のニューロンに働く。レプチンレベルの上昇と低下によって働くニューロンが違うので、MKP-M CS マウス及び野生型マウスから視床下部を取り出し、以下の摂食制御ペプチドやそれらをコードする mRNA を検出し、視床下部にて働いているニューロンを同定した。

B) 胃・小腸を介する経路

1) 摂食刺激シグナルであるグレリン、胃の膨張、消化管ペプチドで満腹シグナルであるコレシストキニンターゲットとして、胃・小腸からのシグナルと視床下部における摂食制御ペプチドについて調べた。

1) 胃から分泌し食欲シグナルを伝える因子としてグレリンに注目した。そしてグレリンとコレシストキノンの脂肪組織における発現は mRNA レベルでも制御されているので、リアルタイム RT-PCR 法により MKP-M CS マウスと野生型マウスにおいて mRNA レベルを比較した。

2) 視床下部における摂食制御ペプチドの mRNA 検出
グレリンはレプチンと違い迷走神経経路で視床下部に働くが、その作用はレプチンと逆に働く。よって、視床下部のシグナルを調べるときはレプチンと同じターゲットの mRNA レベルを検討した。

C) 脳室周囲組織を介する経路

MKP-M CS マウスの摂食中枢へのシグナル経路が A)脂肪組織を介する経路及び B)胃・小腸を介する経路のどちらでも無かった場合のかがえうる経路であるが、結果として B)の経

路であることが判明したのでこの経路は検討しなかった。

4. 研究成果

MKP-M CS マウスの体重増加

MKP-M CS マウスをメタボリックケージにて飼育したところ、野生型マウス (C57BL/6) との比較して MKP-M CS マウスは離乳後食餌量や飲水量は増加し、尿量と体重はともに増加していた (Fig. 1)。MKP-M CS マウスと野生型マウスの食餌量からくる体重差の変化は7週からなくなった。また、メスよりもオスの MKP-M マウスにおいて体

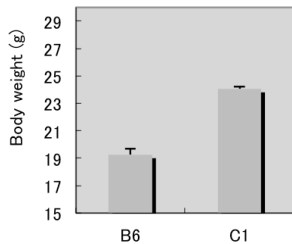


Fig 1 Body weight of male C57BL/6 or MKP-M CS mice at 6 weeks old were measured.

脂肪組織を介する経路 (A)

脂肪組織が分泌する食物摂取を制御する因子であるレプチンの日内変動を検討したところ、摂食後にレプチンの発現上昇が確かめられた。しかし、野生型マウスと比較して MKP-M CS マウスはレプチンの発現が脂肪組織だけでなく胃のどの部位においても発現の違いはなかった。

脳による摂食の制御は主に視床下部においてなされている。満腹シグナルはメラノコルチン前駆体 (POMC) という神経伝達物質によって制御され、摂食シグナルはニューロペプチド Y (NPY) やアグーチ関連タンパク (AgRP) という神経伝達物質によって制御されている。そこで、摂食時と飢餓時において MKP-M CS マウスおよび野生型マウスの視床下部におけるこれら神経伝達物質の発現がどのように変化したか検討した。その結果、POMC と AgRP には意味のある差は認められなかったが、MKP-M CS マウスにおいて摂食時の摂食行動刺激ペプチドである NPY の発現が少ないことが判明した (Fig. 2)。このことは、末梢からの満腹シグナルの減少を予想させるものである。

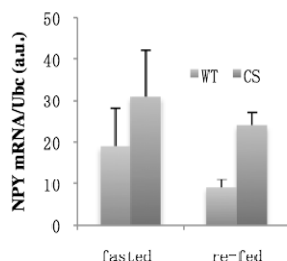


Fig. 2 The expression of NPY in hypothalamus of DUSP16 CS mice. Wilde type or DUSP16 CS mice were fasted for 12 hr (fasted group n= 3) and then re-fed for 30 min or 3 hr (re-fed). Total RNA were isolated from hypothalamus of their mice. The expression of NPY, mRNA were analyzed by real time RT-PCR. The values were normalized by Ubc mRNA expressions.

胃・小腸を介する経路 (B)

胃からは摂食シグナルであるグレリンが小腸からは満腹シグナルである CCK が発現していることが知られている。そこで、摂食時と飢餓時におけるこれらの発現を検討した。野生型マウスと MKP-M CS マウスのグレリン発現の違いは摂食時および飢餓時ともに認められなかったが、摂食時に置ける CCK の小腸における発現の上昇が MKP-M CS マウスでは少ないことが判明した (Fig. 3)。このことは、MKP-M CS マウスにおいて満腹時に摂食刺激神経ペプチドである NPY の発現減少が少ないという知見と一致する。

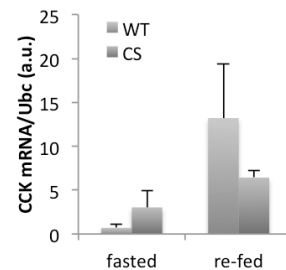


Fig. 3 The expression of appetite associated peptides in digestive organs of DUSP16 CS mice. Wilde type or DUSP16 CS mice at 12 weeks old were fasted for 12 hr (fasted group n= 3) and then re-fed for 30 min (re-fed). Total RNA were isolated from adipose tissue in inguinal region, the fundus of the stomach, and small intestine of their mice. The expression of CCK mRNA were analyzed by real time RT-PCR. The values were normalized by Ubc mRNA expressions

考察

小腸は全体の 60% 以上のリンパ球が存在する場所であり、腸粘膜のリンパ球は基底膜より管腔側に存在し大部分が T 細胞からなることが知られている。MKP-M CS マウスでは T 細胞特異的に DUSP16 のドミナントネガティブが発現しているため DUSP16 のドミナントネガティブはこの小腸の上皮細胞間リンパ球に機能的な異常があることが十分に考えられる。よって、摂食時に MKP-M CS マウスの CCK が小腸からの発現が少ない理由は上皮細胞間リンパ球が関与している

可能性が示唆される。つまり、摂食時腸から吸収された食物成分がこの腸上皮細胞間リンパ球に作用し、これらリンパ球が接している腸上皮細胞の CCK の発現を促すという作用を MKP-M CS が阻害している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5件)

1. Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) influences the multilineage differentiation of mesenchymal stem and progenitor cell lines through ROCK-Cot/Tp12-MEK-ERK signaling pathway.
Kusuyama J, Bandow K, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T.
J Biol Chem. (査読有り) 11; 289(15): 10330-10344. 2014 Apr
2. Long-time treatment by low-dose N-acetyl-L-cysteine enhances proinflammatory cytokine expressions in LPS-stimulated macrophages.
Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Kusuyama J, Matsuguchi T.
PLoS One. (査読有り) 4; 9(2): e87229
2014 Feb
3. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4-MyD88 dissociation.
Nakao J, Fujii Y, Kusuyama J, Bandow K, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T.
Bone (査読有り);58:17-25. 2014 Jan
4. Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats.
Matsui I, Nagasawa Y, Michigami T, Ohnishi T, et al.
Am J Physiol Renal Physiol. (査読有り) 304(6): F751-760. 2013 Jan
5. LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tp12-ERK axis in macrophages.

Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T.

FEBS Lett. (査読有り)

21;586(10):1540-6. 2012 May

〔学会発表〕(計 6件)

1. 骨芽細胞分化に対する遊離脂肪酸の影響
坂東健二郎、楠山譲二、柿元協子、大西智和、松口徹也
第36回日本分子生物学会年会(兵庫)
2013年12月3日~6日
2. マウス頭蓋冠由来骨芽細胞の分化と解糖系の関係
大西智和、坂東健二郎、柿元協子、松口徹也
2nd Joint meeting of the international bone and mineral society and the Japanese society for bone and mineral research
Kobe international conference center
28 May - 1 June, 2013
3. マクロファージにおけるLPSによるCot/Tp12-ERK経路を介したケモカインの誘導
坂東健二郎、楠山譲二、柿元協子、大西智和、松口徹也
第54回歯科基礎医学会学術大会(福島)
2012年9月14日~16日
4. Low-Intensity Pulsed Ultra Sound (LIPUS)が炎症性遺伝子発現に及ぼす影響
松口徹也、楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和
第54回歯科基礎医学会学術大会(福島)
2012年9月14日~16日
5. 骨芽細胞におけるCot/Tp12を介したメカニカルストレスのシグナル伝達経路
楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也

第53回歯科基礎医学会学術大会（岐阜）
2011年9月30日～10月2日

6. Characterization of LPS-induced
OPNHIGH OCNLOW osteoblasts
坂東健二郎、楠山譲二、社本光央、柿元
協子、大西智和、松口徹也
第34回日本分子生物学会年会（神奈川）
2011年12月13日～16日

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 智和 (Tomokazu Ohnishi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：30244247

(2)研究分担者

松口 徹也 (Tetsuya Matsuguchi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10303629

柿元 協子 (Kyoko Kakimoto)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40274849

坂東 健二郎 (Kenjiro Bandow)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50347093

楠山 譲二 (Joji Kusuyama)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：70596105