HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肥満誘導におけるNKT細胞-脂肪細胞の相互作用の役割
Author(s)	佐藤, 雅
Description	配架番号：1694
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7031号
Issue Date	2017-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7031
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67449
Type	doctoral thesis
File Information	Masashi_Sato.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

肥満誘導における NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用の役割

（The role of the interaction between NKT cells and adipocytes in obesity）

２０１７年９月

北　海　道　大　学

佐　藤　　雅

学　位　論　文

肥満誘導における NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用の役割

（The role of the interaction between NKT cells and adipocytes in obesity）

２０１７年９月

北　海　道　大　学

佐　藤　　雅

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 ..... 1 頁

緒言 ..... 3 頁

略語表 ..... 5 頁

実験方法 ..... 6 頁

実験結果 ..... 10 頁

考察 ..... 22 頁

総括および結論 ..... 25 頁

謝辞 ..... 27 頁

引用文献 ..... 28 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Satoh M, Iwabuchi K. Communication between natural killer T cells and adipocytes. *Adipocyte* 5: 389-393, 2016
2. Satoh M, Hoshino M, Fujita K, Iizuka M, Fujii S, Clingan CS, Van Kaer L, Iwabuchi K. Adipocyte-specific CD1d-deficiency mitigates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Sci Rep* 6: 28473, 2016
3. 佐藤　雅、岩渕　和也「NKT 細胞・NK 細胞の脂肪組織における役割」　医学のあゆみ　第 257 巻・第 6 号、681-685, 2016
4. 佐藤　雅、岩渕　和也「代謝性疾患と NKT 細胞」医学のあゆみ　第 254 巻・第 13 号 1169-1174, 2015
5. Iwabuchi K, Satoh M. Invariant NKT cell serves as a novel therapeutic target for control of obesity. *Clin Lipidol* 8 (1): 51-4, 2013
6. 佐藤　雅、岩渕　和也　「内臓脂肪症候群と NKT 細胞 -NKT 細胞による食餌誘導性肥満の促進-」　医学のあゆみ　第 246 巻・第 3 号 215-220, 2013
7. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K. Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* 7(2): e30568, 2012
8. 佐藤　雅、岩渕　和也　「Type II NKT 細胞と肥満」　医学のあゆみ　第 243 巻・第 4 号 322-323, 2012

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Satoh M, Fujita K, Iizuka M, Iwabuchi K: NKT cell - adipocyte interaction is necessary to induce adipose tissue inflammation, The 45rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 5th-7th Dec 2016, Naha
2. 佐藤　雅、岩渕　和也: NKT 細胞-脂肪細胞の相互作用による脂肪組織炎症誘導メカニズム, 第 27 回日本生体防御学会学術総会, 平成 28 年 7 月 7 日～7 月 9 日, 福岡
3. Satoh M and Iwabuchi K: NKT cell – adipocyte interaction modulate adipose tissue function, CD1/MR1 2015, 15th-19th Nov 2015, Lorne (Australia)
4. Satoh M, Eshima K, Takeuchi E, Iwabuchi K: Adipocytes activate NKT cells via CD1d, The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 10th-12th Dec 2014, Kyoto
5. Satoh M, Eshima K, Takeuchi E, Iwabuchi K: Characterization of non-invariant NKT cells in visceral adipose tissue, 42nd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 11th-13th Dec 2013, Chiba

6. Satoh M, Eshima K, Takeuchi E, Iwabuchi K: Characterization of non-invariant NKT cells in visceral adipose tissue, 7th International Symposium on CD1 and NKT cells, 13th-17th Sep 2013, Tours (France)
7. Satoh M, Eshima K, Tamauchi H, Takeuchi E, Iwabuchi K: Non-invariant NKT cells cause diet-induced obesity by tissue inflammation, The American Association of Immunologists Annual Meeting 2013, 3rd-7th May 2013, Honolulu (Hawaii)
8. Satoh M, Eshima K, Tamauchi H, Takeuchi E, Iwabuchi K: Characterization of non-invariant NKT cells in visceral adipose tissue, 41st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 5th-7th Dec 2012, Kobe
9. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Ishimori N, Tsutsui H, Van Kaer L, Onoé K, Iwabuchi K: Type II NKT cells operate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation and steatohepatitis, 40th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 27th-29th Nov 2011, Chiba
10. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Ishimori N, Tsutsui H, Van Kaer L, Onoé K, Iwabuchi K: Type II NKT cells operate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance, The 6th International Symposium on CD1/NKT cells, 23rd-27th Sep 2011, Chicago (USA)
11. Satoh M, Eshima K, Iwabuchi K: Type II NKT cells operate diet-induced obesity, Kyoto T cell Conference (KTCC), 10th-11th Jun 2011, Kyoto
12. Satoh M, Ogura H, Andoh Y, Ishimori N, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Van Kaer L, Onoé K, Iwabuchi K: Type II NKT cells operate diet-induced obesity, 22nd-27th Aug 2010, Kobe
    BD Japan Young Investigators' Travel Award
13. Satoh M, Ogura H, Andoh Y, Ishimori N, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Van Kaer L, Onoé K, Iwabuchi K: Diet-induced obesity is suppressed in CD1d-deficient but not in invariant NKT cell-deficient mice, 39th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2nd-4th Dec 2009, Osaka
14. Satoh M, Iwabuchi K, Ogura H, Onoé K: NKT cells control the volume of visceral fat in mice fed high fat diet (HFD), The 5th International Symposium on CD1/NKT cells, 23rd-27th Mar 2009, Kamakura
    Travel Scholarship

緒　言

肥満や糖尿病などの生活習慣病は、メタボリック症候群の基礎を成し、近年の日本において大きな問題となっている。日本人の 2/3 は生活習慣病が引き金となり死亡しており、中でも、肥満は動脈硬化症をはじめとした様々な疾患の根底にあると言える。肥満は脂肪組織における炎症と考えられ、それは様々な免疫細胞によって制御されていると多くの報告があるが、どのように免疫細胞が活性化され、炎症反応が開始されるのか、その機序は未だ不明な点は多い。

免疫システムは、脂肪組織の機能やホメオスタシスのコントロールにおいて重要な役割を果たすことが近年示されてきた [1-3]。実際に脂肪組織には、マクロファージをはじめ、好酸球や T 細胞、B 細胞などさまざまな免疫細胞が存在する [4-8]。肥満状態の脂肪組織には慢性炎症像を認めるが、その炎症反応にはさまざまな免疫細胞が関わることが知られている。例えば、$CD8^+$ T 細胞や M1 マクロファージから産生される Th1 サイトカインはインスリン抵抗性・肥満を誘導し、好酸球や M2 マクロファージ、制御性 T 細胞から産生される Th2・抑制性サイトカインは脂肪組織炎症・肥満を抑制する [4,5, 8]。これらの知見は、脂肪組織における免疫バランスは脂肪組織炎症をコントロールするのに重要であることを示している。したがって、脂肪組織中の免疫細胞がいかなる相互作用で、どのように活性化されるのかを理解することは、肥満や肥満に伴う生活習慣病に対する新規の予防・治療法の開発に繋がると考えられる。

ナチュラルキラーT 細胞（NKT 細胞）は、CD1d 分子で提示される糖脂質を認識するユニークな T 細胞サブセットである。NKT 細胞は、TCR シグナルにより Th1、Th2、さらには Th17 に及ぶ多様なサイトカインを大量に産生することができる [9,10]。この多様なサイトカインにより、免疫系を調節する細胞として位置づけられている。インバリアント TCRα鎖（マウス : Vα14-Jα18、ヒト : Vα24-Jα18）を発現する invariant NKT 細胞（iNKT 細胞または type I NKT 細胞）は、α-galactosylceramide（α-GalCer）をリガンドとし [11]、また多様な TCR を発現する NKT 細胞（vNKT 細胞または type II NKT 細胞）ではスルファチドが代表的なリガンドとして知られている [12]。NKT 細胞は、脾臓や肝臓、骨髄や胸腺 [10] のほかに、脂肪組織にも存在することが報告されており [13]、いくつかの研究グループが食餌誘導性肥満における NKT 細胞の働きについて報告している。しかしながら、NKT 細胞は肥満の進展に対して中立的 [14]、抑制的 [15-17]、促進的 [18, 19] というように、その役割についての研究結果はさまざまである。我々の先行研究 [18] では、高脂肪食（HFD）給餌において、$CD1d^{-/-}$マウス（iNKT 細胞と vNKT 細胞が欠損）は野生型マウス（WT マウス）や $J\alpha18^{-/-}$マウス（iNKT 細胞のみ欠損）よりも体重増加、内臓脂肪組織重量や肝重量が少ないことを明らかにした（図 1a, b）。耐

糖能試験を行うと、WT マウスと Jα18$^{-/-}$マウスが高血糖を示すのに対して、CD1d$^{-/-}$マウスは最も耐糖能を維持しており、インスリン耐性試験においても CD1d$^{-/-}$マウスが最もインスリンによる血糖低下が認められた（図 1c, d）。このことから、少なくとも vNKT 細胞が残っていれば体重増加やインスリン抵抗性を誘導できることが示唆された。しかしながら、これらの報告の中でも、NKT 細胞が脂肪組織中でどのように活性化されるかは示されておらず、その詳細なメカニズムは未だ不明である。

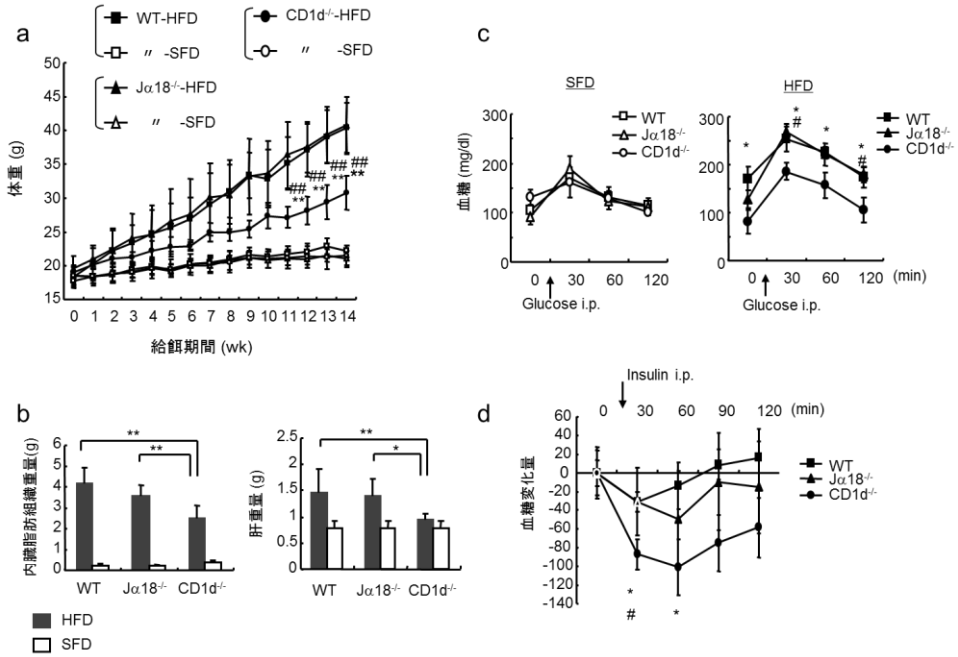

図 1 . CD1d$^{-/-}$マウスは食餌誘導性肥満に抵抗性である

（a, b）各系統のマウス（雌）における体重増加曲線（a）およびエサ給餌 18 週後の内臓脂肪重量、肝重量（b）（n=3-7/群）。（c, d）各系統のマウス（雌）における IPGTT（c）および ITT（d）（n=3-4/群）。3 回行った実験の代表を示す。Tukey-Kramer test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ (WT vs CD1d$^{-/-}$), $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ (Jα18$^{-/-}$ vs CD1d$^{-/-}$)

本研究では、NKT 細胞と脂肪細胞との相互作用に着目し、脂肪細胞が CD1d を介して NKT 細胞に抗原提示できることを示した。さらに、脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスは肥満・インスリン抵抗性が改善することを明らかにし、CD1d 分子を介した NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用は、肥満の進展において重要な役割を持ち、ホストの糖・エネルギー代謝を変化させ得ることが示唆された。

略　語　表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

α-GalCer	α-galactosylceramide
α-GlyCer	α-glycosylceramide
CD	cluster of differentiation
HFD	high fat diet
iNKT	invariant natural killer T cell
IPGTT	intraperitoneal glucose tolerance test
ITT	insulin tolerance test
NKT cell	natural killer T cell
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
SFD	standard fat diet
vNKT	variant natural killer T cell

実　験　方　法

マウス

C57BL/6 マウスは日本クレア、Adiponectin-cre mice (B6;FVB-Tg (Adipoq-cre)1Evdr/J; TJL stock number: 010803)[20] と CD1d1-floxed mice (C57BL/6-Cd1d1$^{tm1.1Aben}$/J; TJL stock number: 016929)[21] はジャクソン研究所から購入した。NKT 細胞欠損として CD1d$^{-/-}$マウス[22]および Jα18$^{-/-}$マウス[23]を使用した。全てのマウスは北里大学医学部遺伝子高次機能解析センターにて、SPF 環境で飼育した。高脂肪食は日本クレアから購入した HFD32（脂肪 32%、タンパク質 25.5%、線維 2.9%、ミネラル 4.0%、窒素 29.4%、水 6.2%）を使用し、生後 8 週から給餌した。全ての動物実験および遺伝子組換え実験は、北里大学医学部動物実験委員会（#2014-141、#2015-063）、医学部遺伝子組換え実験安全管理委員会および北里大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査と学長の承認を得て行っている。

細胞培養

3T3-L1 繊維芽細胞（ATCC, CCL-92.1）は、high glucose DMEM（Sigma, 10% FCS、50 μM β-メルカプトエタノール、100 units/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン）を pre-adipocyte medium として培養した。コンフルエントまで培養した後、differentiation medium（pre-adipocyte medium + 5 μg/ml インスリン(イーライリリー) + 0.5mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン(Sigma) + 0.25 μM デキサメサゾン(Sigma)）で 2 日間培養し、脂肪細胞へ分化誘導した。その後は 2 日おきに insulin-containing medium（pre-adipocyte medium + 5 μg/ml インスリン）で培養液を交換しながら培養した。分化誘導後 7～10 日目に脂肪細胞として実験に使用した。脂肪滴蓄積を調べるために、オイルレッド O（Sigma）による染色を用いた。共培養実験では、プレートをコラーゲンゲル（新田ゼラチン株式会社）でコーティングし、3T3-L1 細胞を培養した。分化させた 3T3-L1 脂肪細胞は、5x10^5 2E10 NKT 細胞ハイブリドーマと、または 2x10^4 のソーティングした NKT 細胞と IL-2（40 ng/ml, BioLegend）存在下で共培養した。外来抗原としてα-GalCer（100 ng/ml, 協和発酵キリン株式会社）、阻害実験には抗 CD1d 抗体（1B1, 20 μg/ml or 50 μg/ml, BioLegend）を使用した。また、リコンビナントマウス IFN-γ（15-150 ng/ml, ペプロテック）、ルクソリチニブ（0.1-3 μM, INCB018424, Selleckchem）をいくつかの実験に使用した。

細胞表面染色

脾臓、肝臓、脂肪組織から調整した細胞浮遊液は 2.4G2 抗体（抗 FcγRIII/II 抗体）で非特異反応を阻害した後、以下の抗体で染色した。FITC 標識 抗 TCRβ 抗

体（H57-597, BioLegend）、 抗 CD11b 抗体（Mac1, TONBO Biosciences）、抗 CD206 抗体（C068C2, BioLegend）、 APC 標識抗 NK1.1 抗体（PK136, BioLegend）、 抗 CD11c 抗体（HL3, BD Pharmingen）、PE 標識抗α-GalCer:CD1d complex 抗体（L363, BioLegend）、α-GalCer（PBS-57）-loaded CD1d tetramer（NIH Tetramer Core Facility at Emory University, Atlanta）、Brilliant Violet 421 標識抗 F4/80 抗体（BM8.1, TONBO Biosciences）。3T3-L1 脂肪細胞は 1.5mM EDTA 添加 PBS で培養プラスチック容器より剥離・単一浮遊細胞として、PE 標識抗 CD1d 抗体（1B1, BioLegend）、抗 CD80 抗体（16-10A1, BD Pharmingen）、抗 CD86 抗体（GL1, BD Pharmingen）で染色した。染色した細胞は、FACS Verse（BD Biosciences）または FACS Calibur（BD Biosciences）で測定し、Flowjo（FlowJo, LLC）ソフトウェアで解析した。

細胞内染色

脂肪組織由来の単核球分画は、脂肪組織を細切し、37℃, 1-1.5h のコラゲナーゼ D（2 mg/ml, Roche）処理をした後、遠心して回収した。得られた細胞は phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10 ng/ml, Sigma)、 ionomycin（1 μg/ml, Sigma）、brefeldin A （5 μg/ml, BioLegend）存在下で 4 時間刺激した後、FOXP3 Fix/Perm Buffer Set（BioLegend）で処理し、PE 標識抗 IFN-γ抗体（XMG1.2, BioLegend）で染色した。染色した細胞は、FACS Verse（BD Biosciences）で測定し、Flowjo（FlowJo, LLC）ソフトウェアで解析した。

サイトカイン測定

培養上清中のサイトカインは、Mouse Th1/Th2/Th17/Th22 13 plex Kit FlowCytomix あるいは 10 plex kit FlowCytomix（Affymetrix）を用いて測定した。

リアルタイム **PCR**

総 RNA は Trizol reagent（Life Technologies）を用いて抽出し、PrimeScript RT Master Mix（TaKaRa）を用いて cDNA を合成した。リアルタイム PCR は、SYBR Premix Ex Taq II（TaKaRa）と以下のプライマーを用いて、CFX96 real time PCR detection system（Bio-Rad）で行い、遺伝子発現は β-actin で標準化して ΔΔCT 法により解析した。*Actb* (forward 5′-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3′; reverse 5′-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3′), *Cd1d1* (forward 5′-ACTCAGCCACCATCAGCTTC-3′; reverse 5′-AGGGTACATTTCACAGCCCG-3′), *Cd80* (forward 5′-CCTGGCTTTCCCCATCATGT-3′; reverse 5′-AGAGTTGTAACGGCAAGGCA-3′), *Cd86* (forward 5′-CTTACGGAAGCACCCACGAT-3′; reverse 5′-CAACTTTTGCTGGTCCTGCC-3′), *Pparg* (forward 5′-ATGGAGCCTAAGTTTGAGTTGC-3′; reverse

5′-TGTCCTCGATGGGCTTCA-3′), *Fabp4* (forward 5′-TGAAATCACCGCAGACGACA-3′; reverse 5′-GGCCTCTTCCTTTGGCTCAT-3′), *Mttp* (forward 5′-CTTCTTCATCTGGTCCGGGG-3′; reverse 5′-CCAGACCGCTCAATTTTGCA-3′), *Ccl2* (forward 5′-CCCAATGAGTAGGCTGGAGA-3′; reverse 5′-GCTAAGACCTTAGGGCAGA-3′), *Cxcl16* (forward 5′-CCTTGTCTCTTGCGTTCTTCC-3′; reverse 5′-TCCAAAGTACCCTGCGGTATC-3′), *Adipoq* (forward 5′-ACAGGAGATGTTGGAATGACAG-3′; reverse 5′-CTGCCGTCATAATGATTCTGTT-3′), *Ifngr1* (forward 5′-GACGAGCACTGAGGATCCTG-3′; reverse 5′-CTTTAACTCTGGCCCAGGCA-3′), *Ifngr2* (forward 5′-CCTGATTCCGTTGGGCATCT-3′; reverse 5′-CCGTCCTTGTCCAAGACCTC-3′), *Il6* (forward 5′-CACATGTTCTCTGGGAAATCG-3′; reverse 5′-TTGTATCTCTGGAAGTTTCAGATTGTT-3′), *Tnf* (forward 5′-GCCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3′; reverse 5′-GGGTCTGGGCCATAGAACTGAT-3′), *Il10* (forward 5′-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3′; reverse 5′-GCGAGCTCTAGGAGCATGTG-3′), *Ifng* (forward 5′-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3′; reverse 5′-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3′) and *Itgam* (forward 5′-AGTGTCTGTGGTGCCTGAAA-3′; reverse 5′-TAACAGCCTTTGCCTCCTGG-3′) (北海道システムサイエンス株式会社)

ウェスタンブロッティング

3T3-L1 脂肪細胞に IFN-γおよびルクソリチニブ（IFN-γ添加の 1 時間前）、ロシグリタゾン（IFN-γ添加の 24 時間前）あるいは溶剤を作用させ、NP-40 を用いて whole cell lysate を回収した。10-20 μg の総タンパク質を SDS-PAGE（10% Mini-PROTEAN Precast Gels, Bio-Rad）により電気泳動し、PVDF 膜にブロットした。ブロッキング後、抗 STAT1 抗体（1:1000）、抗リン酸化 STAT1 抗体（1:1000）（PhosphoPlus® Stat1 (Tyr701) Antibody Kit, Cell Signaling TECHNOLOGY）、Adipogenesis Marker Antibody Sampler Kit （抗 adiponectin 抗体(1:1000)、抗 PPARγ 抗体(1:1000)）、コントロールとして抗β-actin 抗体（1:1000, BioLegend）を反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体（1:1000）と ELC 基質で発色させて ImageQuant LAS 4000 system（GE Healthcare）で撮影した。

組織標本作製

脂肪組織は 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した後に HE 染色を行った。HE 染色標本は、BIOREVO microscope（BZ-9000; KEYENCE）で画像を取り込み、脂肪細胞の周囲径は同ソフトウェア（BZ-II）で解析した。肝臓は OCT compound（Sakura Finetek）に包埋、液体窒素で凍結させ、薄切し標本を作製した。凍結切片はオイルレッド O 染色を行い、赤く染まった脂肪滴部分を BZ-II ソフトウェアにて解析した。

血液生化学

血清中のトリグリセリド（TG）と ALT 濃度は、DRI-CHEM 7000 V（FUJIFILM）、インスリン濃度はマウス insulin ELISA kit（Morinaga）を用いて測定した。

耐糖能試験（**IPGTT**）・インスリン耐性試験（**ITT**）

IPGTT は、マウスを 16 時間絶食後、グルコース液（1 g/kg）を腹腔内投与し、メディセーフミニ（テルモ株式会社）を用いて経時的に血糖を測定した。ITT は、マウスを 3.5 時間絶食後、インスリン（0.75 U/kg、ヒューマリン R、イーライリリー）を腹腔内投与し、メディセーフミニを用いて経時的に血糖を測定した。

統計解析

各データは平均±標準偏差で示している。2 群間の統計解析には Student’s *t*-test、3 群間には Tukey-Kramer tests（ANOVA）を用いた。P 値が 0.05 以下のとき、統計学的有意差があるとした。

実　験　結　果

脂肪細胞は CD1d と共刺激分子 CD80 を発現する

成熟した脂肪細胞が NKT 細胞を活性化できるかを *in vitro* で調べるために、3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させて使用した。分化させた 3T3-L1 脂肪細胞（以下単に 3T3-L1 脂肪細胞）は、脂質の染色で使用されるオイルレッド O 染色により赤く染色された脂肪滴を蓄積し、*Pparg* や *Fabp4* のような脂肪細胞分化マーカーを発現するようになり（図 2a）、分化に伴い *Cd1d1* の発現も増加した（図 2b）。抗原提示による T 細胞の活性化には、T 細胞受容体シグナルとともに共刺激分子からのシグナルも必要であるが、その共刺激分子 *Cd80* も脂肪細胞分化に伴い発現が増加した（図 2b）。しかし一方で、*Cd86* の発現は認められなかった（図 2b）。さらに、WT マウスの内臓脂肪組織から分離した成熟脂肪細胞においても、*Cd1d1* の発現が認められ、CD1d$^{-/-}$マウスにおいては発現していなかった（図 2c）。この成熟脂肪細胞分画では CD11b（*Itgam*）が陰性であり、マクロファージなどのミエロイド系細胞が含まれていないことを確認した（図 2d）。これらの結果より、脂肪細胞は CD1d と共刺激分子 CD80 を発現しており、NKT 細胞に抗原提示が可能であることが示された。

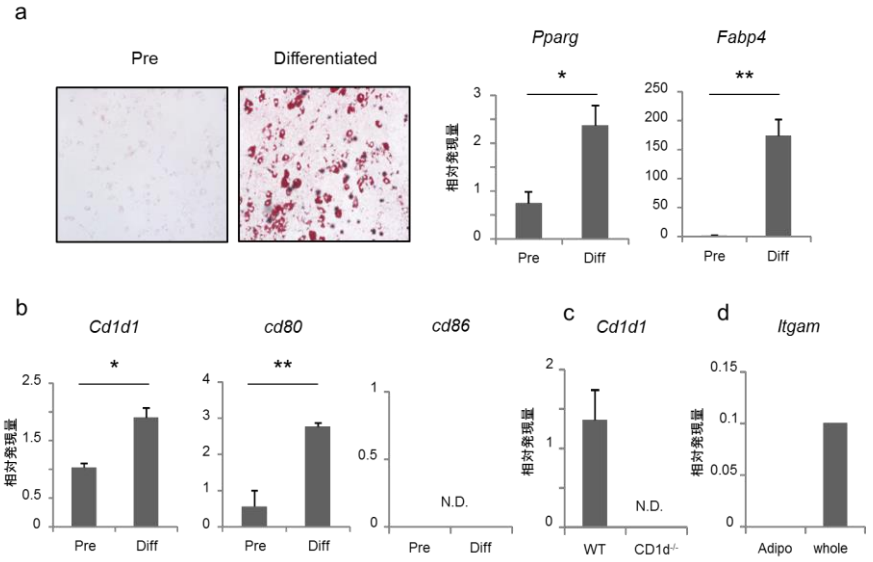

図２. 3T3-L1 脂肪細胞 CD1d と共刺激分子 CD80 を発現する

（a, b）3T3-L1 細胞の分化誘導前（Pre）と分化誘導後の（Diff）におけるオイルレッド O 染色、遺伝子発現比較。（c）WT マウスおよび CD1d$^{-/-}$マウスの内臓脂肪組織から単離した脂肪細胞分画における *Cd1d1* 発現比較。（d）WT マウスの内臓脂肪組織から単離した脂肪細胞分画（Adipo）と脂肪組織全体（Whole）における *Itgam* の発現比較。3 回行った実験の代表を示す。Student's *t*-test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

3T3-L1 脂肪細胞は iNKT 細胞にα-GalCer を提示する

3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化させるには、2-3 週間の培養期間が必要であり、その間にプレートから剥がれてしまうことがしばしばあった。それを回避するために、あらかじめコラーゲンをプレートにコーティングし、その上で 3T3-L1 細胞を培養することでこの問題は解決された。そのため、NKT 細胞との共培養実験の際には、コラーゲンコート上に 3T3-L1 細胞を培養することにした。3T3-L1 脂肪細胞の NKT 細胞の活性化能を調べるために、iNKT 細胞ハイブリドーマである 2E10 細胞を外来抗原として iNKT 細胞を活性化するα-GalCer の存在下で 3T3-L1 脂肪細胞と共培養した。2E10 細胞は 3T3-L1 脂肪細胞が提示するα-GalCer に反応し、IL-2 や IL-6、IFN-γ、TNF-α、GM-CSF、IL-4 を産生し、その産生は抗 CD1d 抗体によって阻害されることが判明した（図 3a）。次に、ハイブリドーマではなく生体の NKT 細胞として、WT マウスの脾臓から単離した TCRβ^+NK1.1$^+$ NKT 細胞（iNKT 細胞と vNKT 細胞を含む）が 2E10 細胞と同様に反応するかを調べた。本来、脂肪細胞は脂肪組織中の NKT 細胞と相互作用するはずであり、マウスの脂肪組織から NKT 細胞を単離することが生理的に正確であると思われるが、そこから回収できる NKT 細胞数が非常に少なく、十分な数を確保できなかったため、本実験では細胞数が確実に取れる脾臓 NKT 細胞を使用することとした。結果は、2E10 と同様に CD1d 依存的なサイトカイン産生が認められた（図 3b）。このことから、3T3-L1 脂肪細胞は CD1d を介してマウス NKT 細胞にα-GalCer を提示して活性化できることが示された。

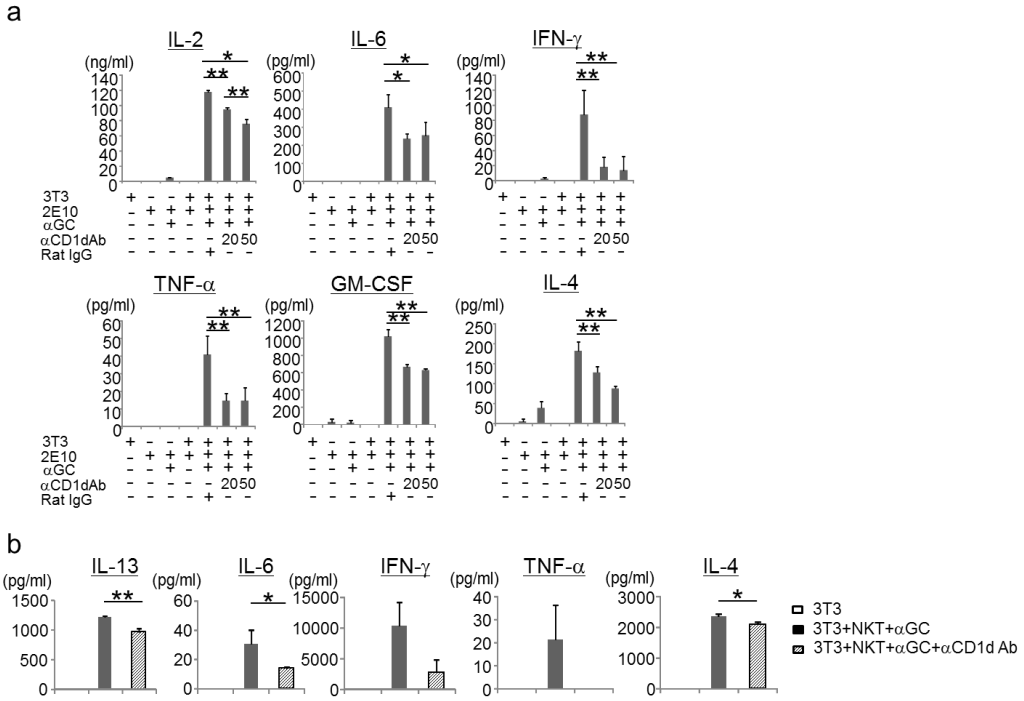

図３. 3T3-L1 脂肪細胞は CD1d を介してα-GalCer を iNKT 細胞に提示する

（a, b）2E10 ハイブリドーマ（a）または WT マウスの脾臓からソーティングした NKT 細胞（TCRβ^{+}NK1.1^{+}）（b）と 3T3-L1 脂肪細胞をα-GalCer、IL-2、抗 CD1d 抗体（α-CD1d Ab）存在下および非存在下で共培養したときの上清中のサイトカイン測定。2 回行った実験の代表を示す。Tukey-Kramer test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

iNKT 細胞と vNKT 細胞はα-GalCer 非添加時も 3T3-L1 脂肪細胞によって活性化される

脂肪細胞が NKT 細胞を活性化し得る内因性抗原を発現しているかを調べるために、NKT 細胞を外来抗原非存在下で 3T3-L1 脂肪細胞と共培養した。WT マウスの脾臓から単離した iNKT 細胞（TCRβ^{+}α-GalCer/CD1d tetramer^{+}）は、Th1/Th2 サイトカインを産生することができた（図 4a）。また、iNKT 細胞欠損マウスである Jα18$^{-/-}$マウスの 1 匹あたりの脾臓中の vNKT 細胞（TCRβ^{+}NK1.1^{+}）は、WT マウスにおける iNKT 細胞よりも格段に細胞数が少ないため、2-3 匹分をプールして vNKT 細胞を単離することにした。vNKT 細胞は 3T3-L1 脂肪細胞と共培養することにより、IFN-γや TNF-α、IL-6 を産生することができた（図 4b）。これらのサイトカイン産生は抗 CD1d 抗体により阻害され、iNKT 細胞、vNKT 細胞共に CD1d 依存的に活性化されることが示された（図 4a, b）。IL-6 は 3T3-L1 脂肪細胞からも産生されるため、抗 CD1d 抗体による阻害が見えにくいと考えられる。これらの結果から、3T3-L1 脂肪細胞は iNKT 細胞と vNKT 細胞を両方活性化し得る内因性抗原を発現していることが示唆された。

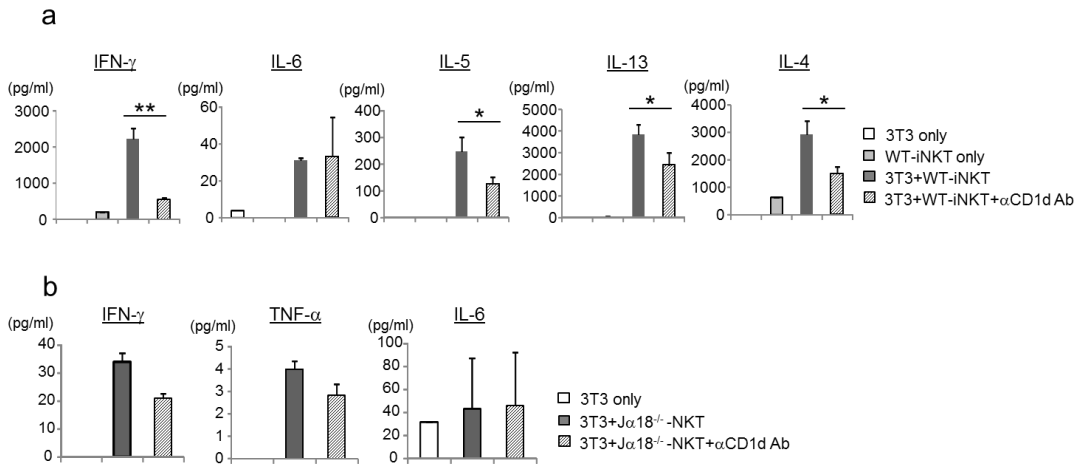

図４. 3T3-L1 脂肪細胞は内因性抗原を NKT 細胞に提示する

（a, b）WT マウスの脾臓から iNKT 細胞（TCRβ^{+}αGC tet^{+}）（a）または Jα18$^{-/-}$マウスの脾臓から NKT 細胞（TCRβ^{+}NK1.1^{+}）（b）をソーティングし、3T3-L1 脂

肪細胞と IL-2、α-CD1d Ab 存在下または非存在下で共培養したときの上清中のサイトカインを測定した。3 回行った実験の代表を示す。Tukey-Kramer test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

3T3-L1 脂肪細胞はα-glycosylceramide（α-GlyCer）を発現しない

NKT 細胞の内因性抗原の一つにα-GlyCer（α-GalCer や α-GlcCer: α-glucosylceramide など）が知られており、L363 抗体はα-GlyCer/CD1d 複合体を認識するため、L363 抗体によってα-GlyCer の発現を間接的に調べることができる。基礎実験として、RBL-CD1d と 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、α-GalCer をロードすると染色され、α-GalCer と purified L363 抗体を両方添加すると L363 抗体の染色がブロックされることを確認した（図 5a）。L363 抗体は RAW264.7、RBL、RBL-CD1d、3T3-L1 脂肪細胞を染色しても陰性であったが、α-GalCer をロードした後に L363 抗体で染色すると、CD1d を発現している RBL-CD1d と 3T3-L1 脂肪細胞は陽性であった（図 5b, c）。TNF-αはある種の細胞（樹状細胞株 DC3.2）ではα-GlyCer を誘導できることが報告されているが [24]、3T3-L1 脂肪細胞に TNF-αを作用させても L363 抗体エピトープの発現は陰性であった（図 5d）。したがって、3T3-L1 脂肪細胞はα-GlyCer 以外の内因性抗原を発現している可能性が考えられた。

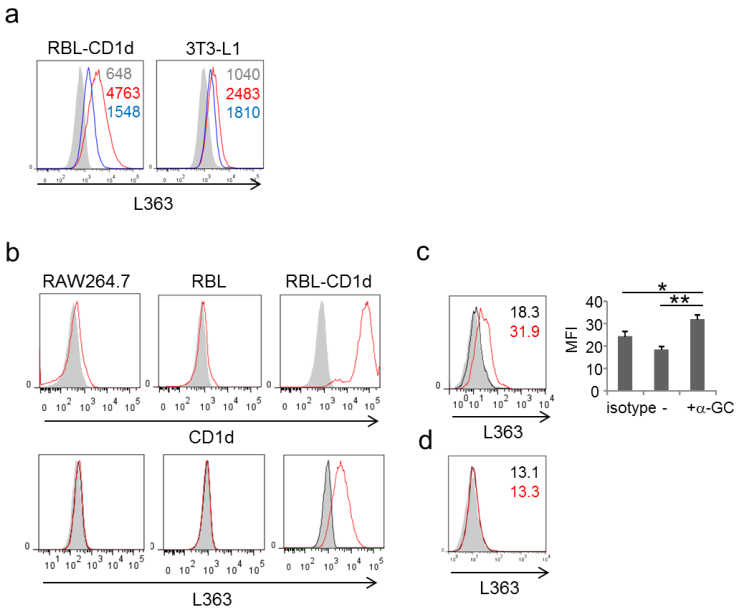

図 5. 3T3-L1 脂肪細胞が発現する NKT 細胞の内因性抗原

（a）RBL-CD1d および 3T3-L1 脂肪細胞における L363 抗体による染色（グレー：isotype control、赤線：α-GalCer load、青線：α-GalCer load + L363 抗体）。（b）RAW264.7、RBL、RBL-CD1d における CD1d 発現（グレー：isotype control、赤

線：抗 CD1d 抗体）およびα-GalCer:CD1d complex（L363）発現（グレー：isotype control、赤線：α-GalCer load あり）のフローサイトメトリー解析。（c）3T3-L1 脂肪細胞におけるα-GalCer:CD1d complex（L363）発現（グレー：isotype control、黒線：α-GalCer load なし、赤線：α-GalCer load あり）。（d）3T3-L1 脂肪細胞におけるα-GalCer:CD1d complex（L363）発現（グレー：isotype control、黒線：TNF-α なし、赤線：TNF-αあり(2 ng/ml, 20h)）。パネルに記載した数字は平均蛍光強度（MFI）を示す。2 回行った実験の代表を示す。Tukey-Kramer test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

肥満脂肪組織中の NKT 細胞は IFN-γを産生する

マウスの内臓脂肪組織における NKT 細胞の活性化状態を調べるために、NKT 細胞（TCRβ^{+}NK1.1^{+}）中の IFN-γ産生を SFD と HFD 給餌マウス間で比較した。NKT 細胞中の IFN-γ^{+}分画（IFN-γ産生細胞の割合）は、HFD 給餌 WT マウス（肥満）のほうが SFD 給餌 WT マウス（通常）よりも多く（図 6a）、IFN-γ^{+}の NKT 細胞数また NK 細胞数においても HFD 給餌 WT マウスの方が増加していた（図 6b）。さらに、Jα18$^{-/-}$マウスにおいても同様に、HFD 給餌マウス（肥満）で IFN-γ^{+} NKT 細胞、NK 細胞の増加が認められた（図 6c）。このことから、肥満マウスの内臓脂肪組織では、iNKT 細胞と vNKT 細胞の両方、さらには NK 細胞が集積し、IFN-γを強く産生するようになることが示された。

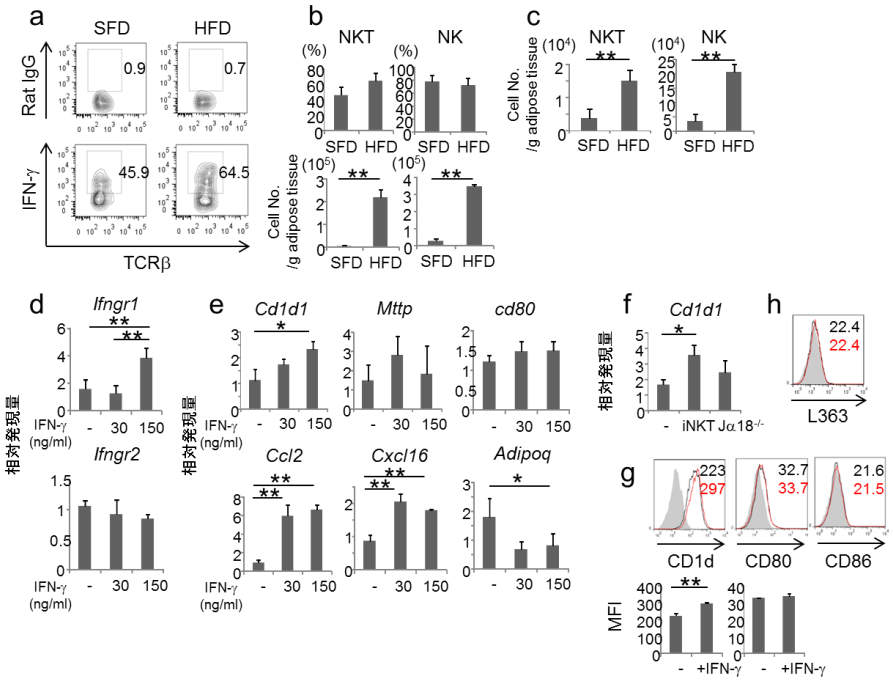

図６. IFN-γは 3T3-L1 脂肪細胞の CD1d 発現を増加させる

（a-c）SFD または HFD を給餌させた WT マウスおよび Jα18$^{-/-}$マウスの脂肪組織中 NKT 細胞と NK 細胞における IFN-γの発現解析（n=3/群）。WT マウスにおける NKT 細胞（TCRβ^{+}NK1.1^{+}）の IFN-γ細胞内染色（a）、WT マウス（b）と Jα18$^{-/-}$（c）マウスにおける IFN-γ^{+} NKT 細胞と NK 細胞（TCRβ^{-}NK1.1^{+}）の割合および細胞数（/g 組織）。（d, e）IFN-γ（0, 30, 150 ng/ml, 3 日間）で刺激したときの 3T3-L1 脂肪細胞における遺伝子発現解析。（f）3T3-L1 脂肪細胞と WT マウスの iNKT 細胞または Jα18$^{-/-}$マウスの NKT 細胞と共培養したときの上清で刺激したときの 3T3-L1 脂肪細胞の *Cd1d1* 発現解析。（g, h）IFN-γで刺激した時の 3T3-L1 脂肪細胞における CD1d、CD80、CD86 発現（g）とα-GalCer:CD1d complex（L363）発現（h）のフローサイトメトリー解析（グレー : isotype control、黒線 : IFN-γなし、赤線 : IFN-γあり）。パネルに記載した数字は MFI を示す。2 回行った実験の代表を示す。Student's *t*-test および Tukey-Kramer test を用いて統計解析を行った。
$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

IFN-γは脂肪組織炎症を促進する

NKT 細胞より産生される IFN-γが脂肪細胞に対してどのような効果があるのかを調べるために、3T3-L1 脂肪細胞に IFN-γを作用させ、遺伝子発現の変化を観察した。IFN-γの処理時間は、1 日目よりも 3 日目において遺伝子発現の増減が顕著であったため、本実験では IFN-γ処理 3 日目の遺伝子発現変化を示した。まず、3T3-L1 脂肪細胞の *Ifngr1* と *Ifngr2* の発現を調べたところ、どちらとも発現が認められた（図 6d）。IFN-γのシグナル伝達は STAT1 のリン酸化（Y701）を伴うが、3T3-L1 脂肪細胞においても刺激後 10 分・30 分で STAT1 のリン酸化が確認できた（図 7a）。IFN-γ刺激を受けた 3T3-L1 脂肪細胞は、*Cd1d1* の発現が亢進し、*Ccl2* や *Cxcl16* といったケモカインの発現も増加していた。CD1d への抗原のローディングに重要な *Mttp* の発現も増加傾向であった。一方、抗炎症作用を示す *Adipoq* の発現は有意に低下しており（図 6e）、IFN-γによって脂肪組織内への細胞浸潤、炎症の増強が誘導されることが示唆された。Ruxolitinib は Jak1/Jak2 の阻害剤であり、IFN-γ刺激による STAT1 のリン酸化が抑制できる（図 7b）。STAT1 のリン酸化を阻害すると、IFN-γによる *Cd1d1* や *Ccl2* の発現増加と *Adipoq* の発現低下が認められなくなった（図 7c）。IFN-γによる adiponectin とその上流の調節因子 PPARγのタンパク質発現の変化を western blot での確認を試みたが、それを評価できる結果は得られなかった。Adiponectin の抗体量の検討や、positive control として PPARγのアゴニストであるロシグリタゾンの使用も試みたが adiponectin のバンドは得られなかった（図 7d）。*Cd1d1* の発現増加は、3T3-L1 脂肪細胞と NKT 細胞の共培養上清を IFN-γの代わりに作用させても認められ（図

6f)、NKT 細胞と脂肪細胞の相互作用により脂肪細胞の抗原提示能が高まることが示唆された。IFN-γによる 3T3-L1 脂肪細胞表面の CD1d の発現増加はフローサイトメーターでも確認できたが、CD80 や CD86 の発現は変化なく（図 6g)、またα-GlyCer/CD1d 複合体の発現も認められなかった（図 6h)。

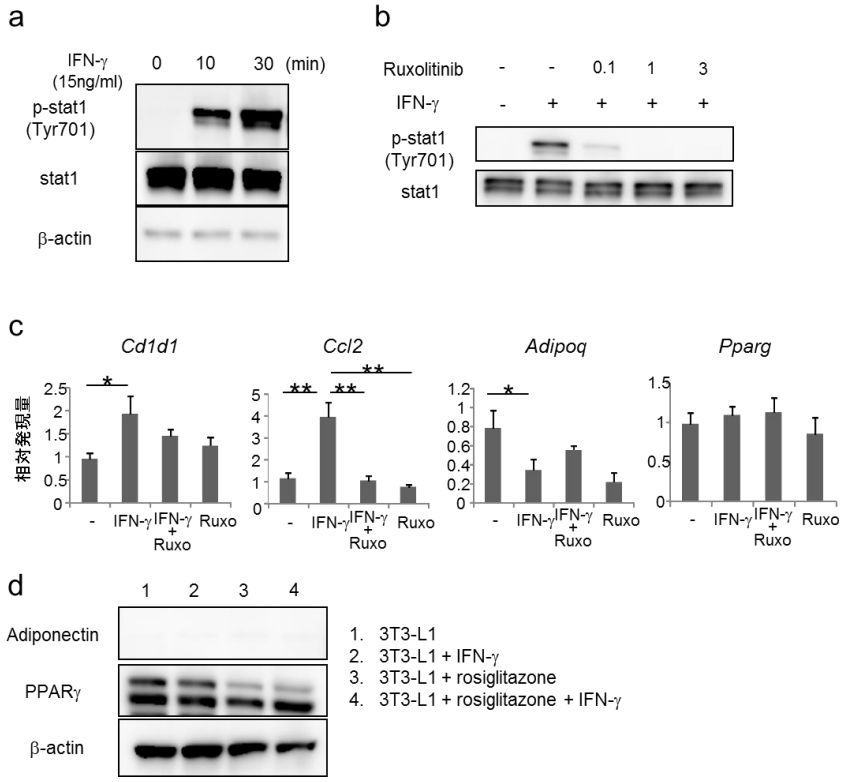

図 7 . IFN-γ-STAT1 シグナリングは 3T3-L1 脂肪細胞の遺伝子発現を調節する

（a）3T3-L1 脂肪細胞における IFN-γ（15 ng/ml）刺激時のリン酸化 stat1（p-stat1）、stat1、β-actin のタンパク質発現量の比較。（b）ルクソリチニブによる stat1 のリン酸化の抑制。（c）ルクソリチニブによる IFN-γ刺激時の遺伝子発現修飾。（d）IFN-γ、ロシグリタゾン（1μM）による Adiponectin と PPARγのタンパク質発現修飾。2 回行った実験の代表を示す。Tukey-Kramer test を用いて統計解析を行った。
$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

CD1d$^{f/f}$-adipoq-cre マウスは食餌誘導性肥満に抵抗性である

NKT 細胞と脂肪細胞の相互作用が、*in vivo* において脂肪組織炎症と肥満に対して重要な役割を果たしているかを調べるために、CD1d1$^{f/f}$ マウス [20] と adiponectin-cre マウス [21] をかけ合わせて、CD1d$^{f/f}$-adipoq-cre マウス（KO マウス）を作製した。まず、脂肪細胞上の CD1d を免疫染色により調べるために、一次抗体と二次抗体の濃度の検討を行い、一次抗体の抗 CD1d 抗体は 100 倍希釈、二次抗体の Alexa488 α-rat IgG は 200 倍希釈で染色することとした。

CD1d$^{fl/wt}$-adipoq-cre マウス（コントロールマウス）では脂肪細胞および脂肪細胞間の間隙に存在する細胞の両者が陽性となり、KO マウスでは脂肪細胞のみで CD1d が陰性となることが確認できた（図 8a）。また、胸腺細胞や樹状細胞、B 細胞、マクロファージなどの非脂肪細胞は KO マウスでもコントロールマウスと同様の CD1d 発現を示した（図 8b）。HE 染色において、内臓脂肪細胞の大きさを調べると、KO マウスのほうがコントロールマウスよりも有意に小さいことが判明した（図 8c）。さらに、内臓脂肪組織における *Tnf*、*Il6*、*Ccl2* のような炎症性サイトカイン・ケモカインの発現は KO マウスではコントロールマウスに比べて減少し、一方で、*Adipoq* の発現は KO マウスで増加していた（図 8d）。*Pparg* や *Il10* の発現量には差がなく、HFD 給餌 8 週時の *Ifng* の発現はコントロールマウスのほうが増加傾向であった。興味深いことに、HFD 給餌 3 日という早期のポイントにおいて、コントロールマウスでは KO マウスよりも有意に *Ifng* の発現増加が認められ（図 8e）、それとは反対に、*Adipoq* の発現が KO マウスでは増加していた（図 8f）。

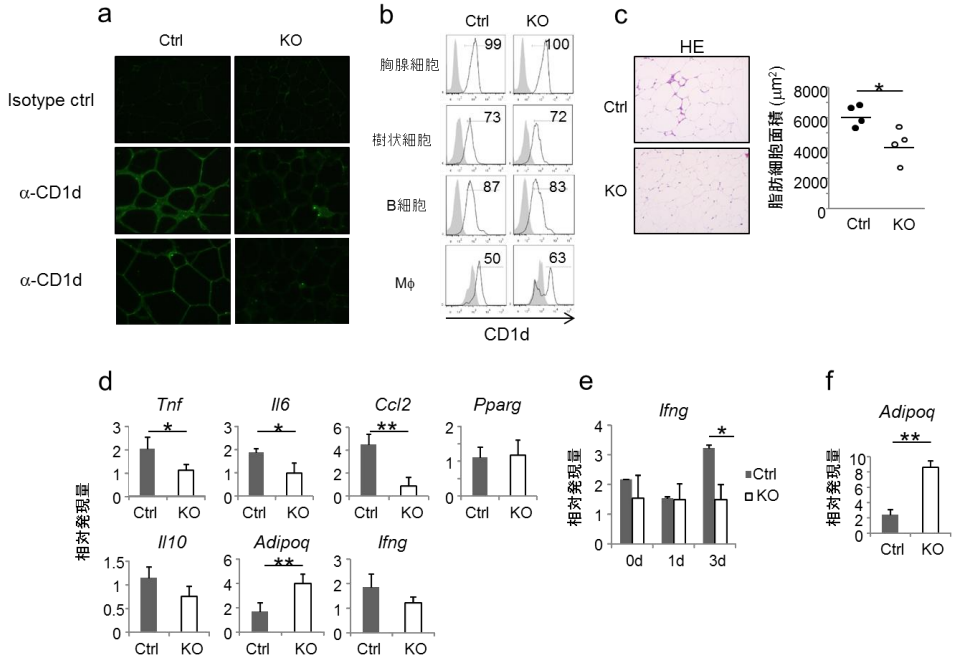

図８．脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスでは脂肪組織炎症が抑制される

（a）脂肪組織切片における CD1d の免疫染色（α-CD1d Ab + Alexa488 α-rat IgG）。KO マウスでは脂肪細胞表面の染色は陰性であるが、間隙に存在する細胞のシグナルは観察される。（b）胸腺細胞（CD4$^+$CD8$^+$）、脾臓樹状細胞（DC, CD11b$^+$CD11c$^+$）、脾臓 B 細胞（B220$^+$）、脂肪組織マクロファージ（CD11b$^+$F4/80$^+$）における CD1d 発現解析。（n=2/群）。（c）脂肪組織切片における HE 染色と脂肪細胞周囲径の測定（n=4/群）。（d）HFD 8 週間給餌後の脂肪組織における遺伝子発現解析（n=4/

群)。(e, f) HFD 給餌 0, 1, 3 日後の脂肪組織における *Ifng* 発現 (e) および HFD 給餌 3 日後の *Adipoq* 発現 (f) 解析 (n=2-4/群)。3 回行った実験の代表を示す。Student's *t*-test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

KO マウスの HFD による体重増加は、摂食量に依存せず、コントロールマウスに比べて有意に少なかった (図 9a-c)。しかし、この体重増加の差は SFD 給餌時には認められなかった (図 10a)。褐色脂肪組織重量には差はみとめられなかったが、内臓脂肪組織重量と肝重量も KO マウスではコントロールマウスよりも有意に少ないことがわかった (図 9c)。それに加えて、肝臓における脂質の蓄積 (オイルレッド O 染色陽性) の抑制、血清 ALT のレベルも低いことから、KO マウスでは脂肪肝が抑制されていた (図 9d, e)。耐糖能試験 (IPGTT) を行ったところ、KO マウスは HFD 給餌においてもインスリン感受性を維持していた (図 9f)。SFD 給餌時には、絶食時の血糖値は KO マウスとコントロールマウスとは同等であったが、IPGTT 2 時間後の血糖値は KO マウスにおいて有意に低かった (図 10b)。血清インスリン値もまた、HFD 給餌において KO マウスで有意に低く (図 9g)、脂肪細胞の CD1d を欠損させることでインスリン感受性が改善されることが示唆された。

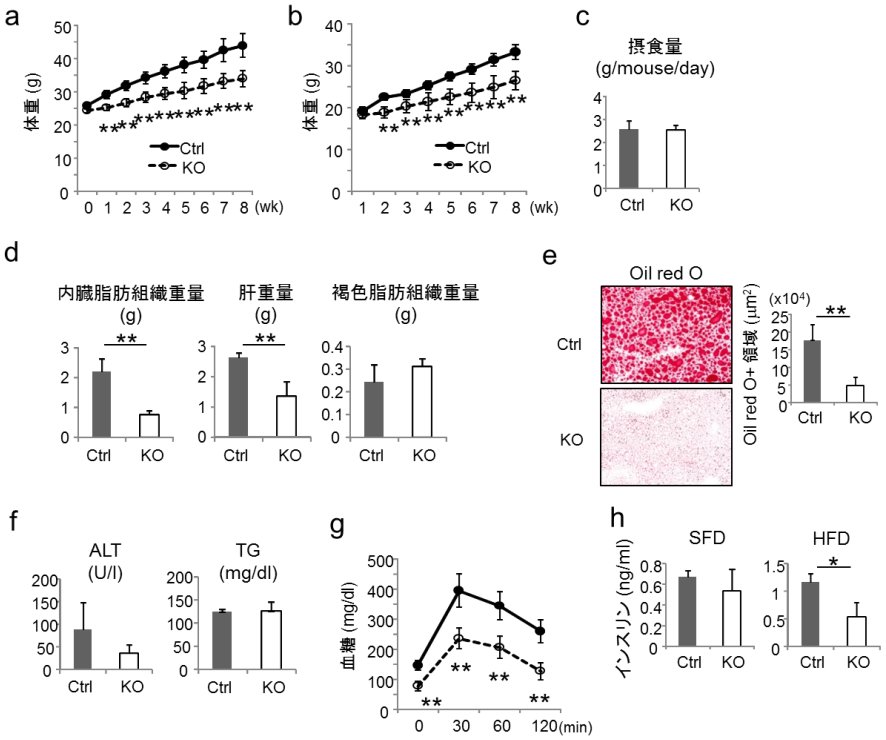

図 9. 脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスは食餌誘導性肥満に抵抗性である

(a, b) KO マウス (○)・コントロールマウス (●) における HFD 給餌による体重増加曲線 (n=4/群) (雄マウス (a), 雌マウス (b))。(c) マウス 1 匹あ

たりの摂食量/日。（d）HFD 8 週間給餌（以下単に HFD8 週）後の内臓脂肪組織重量、肝重量および褐色脂肪組織重量。（e）肝臓切片におけるオイルレッド O 染色とその陽性領域面積の比較。（f）HFD 8 週後の血清 ALT 値とトリグリセリド（TG）値の測定。（g）HFD 8 週後に行った IPGTT。（h）HFD 8 週後の血清インスリン値の測定（n=3/群）。c-h は雄マウスのデータを示す。3 回行った実験の代表を示す。Student's *t*-test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

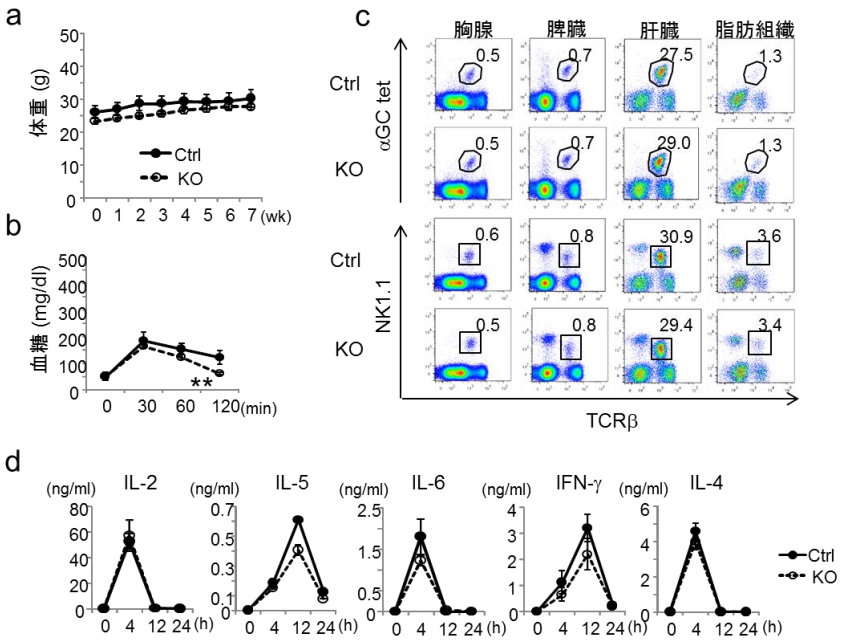

図１０. SFD 給餌による脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスの解析

（a）KO マウス（○）およびコントロールマウス（●）における SFD 給餌による体重増加曲線（n=4-5/群）。（b）SFD 8 週後に行った IPGTT。（c）SFD 8 週後の胸腺、脾臓、肝臓、脂肪組織における iNKT 細胞（$TCR\beta^{+}\alpha GC\ tet^{+}$）と NKT 細胞（$TCR\beta^{+}NK1.1^{+}$）のフローサイトメトリー解析。（d）α-GalCer の静脈投与時の（2μg/マウス）経時的血清サイトカイン測定（n=3/群）。2 回行った実験の代表を示す。Student's *t*-test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

脂肪細胞によって活性化された NKT 細胞はマクロファージをリクルートする

KO マウスで肥満が抑制されるメカニズムを詳しく調べるために、NKT 細胞の解析を進めた。 KO マウスとコントロールマウスにおいて、胸腺細胞の CD1d 発現が同等であったように（図 8b）、KO マウスにおいても胸腺での NKT 細胞の成熟や、脾臓、肝臓、脂肪組織での NKT 細胞の分布は正常であった（図 10c, 図 11a）。α-GalCer 投与によるサイトカイン産生においても、コントロールマウスとの差はなく、iNKT 細胞機能にも異常がないことを示している（図 10d）。脾

臓、肝臓、脂肪組織における iNKT 細胞（TCRβ^{+}αGC/tet^{+}）と NKT 細胞（TCRβ^{+}NK1.1^{+}）の割合は、コントロールマウスに比べて KO マウスで高かった（図 11a, 上パネル）。同様に、脾臓と肝臓の NKT 細胞数も KO マウスで増加していたが、脂肪組織においては、KO マウスでは細胞浸潤が少なく、NKT 細胞数は減少していた（図 11a, 下パネル）。脂肪組織中 NKT 細胞の CD69（活性化マーカー）の発現は、コントロールマウスよりも KO マウスで低く（図 11b）、これは脾臓や肝臓においても同様であった。さらに、脂肪組織中の IFN-γ産生 NKT 細胞も KO マウスのほうがコントロールマウスよりも少ないことから、NKT 細胞は脂肪細胞の CD1d を介して活性化され、IFN-γを産生することを示している（図 11c）。それに加えて、M1/M2（CD11c^{+}/CD206^{+}）表面マーカーや遺伝子発現（*Nos2, Arg1*）におけるはっきりとした違いは認められなかったが、マクロファージの脂肪組織への浸潤も KO マウスでは少なかった（図 11d, e）。これらの結果より、NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用は NKT 細胞の活性化を促進し、脂肪組織へのマクロファージの浸潤を増加させ、脂肪組織炎症・食餌誘導性肥満を誘導することが示唆された。

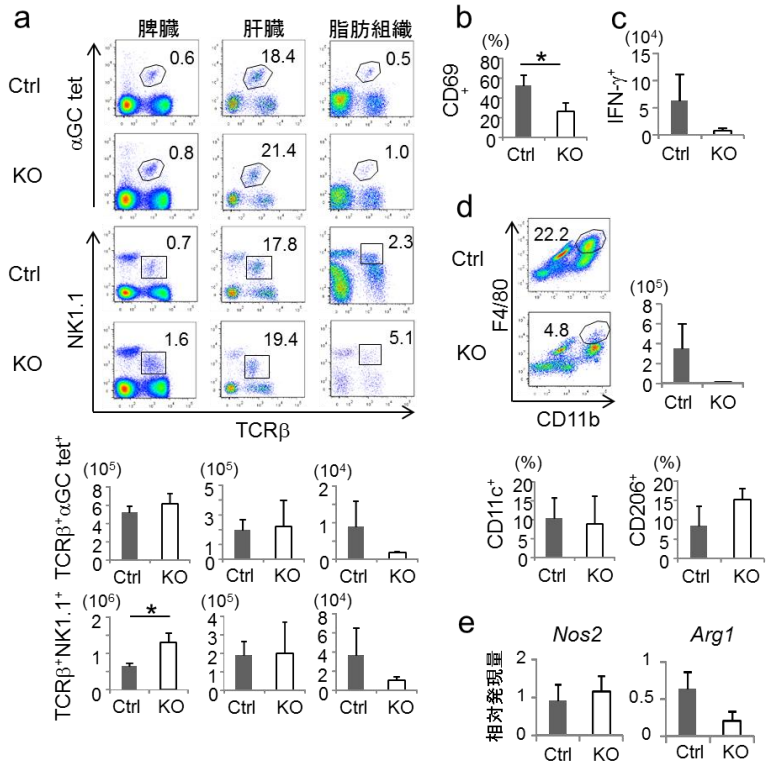

図１１．脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスでは NKT 細胞の活性化とマクロファージの集積が抑制される

(a) HFD 8 週後の脾臓、肝臓、脂肪組織における iNKT 細胞（TCRβ^{+}αGC tet^{+}）と NKT 細胞（TCRβ^{+}NK1.1^{+}）のフローサイトメトリー解析。棒グラフは細胞数

を示す（n=4/群）。（b）脂肪組織中 NKT 細胞の CD69 の発現割合。（c）脂肪組織中の IFN-γ^+ NKT 細胞数。（d）脂肪組織中マクロファージのフローサイトメトリー解析。（e）脂肪組織における *Nos2* と *Arg1* の遺伝子発現。3 回行った実験の代表を示す。Student's *t*-test を用いて統計解析を行った。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

考　察

3T3-L1 脂肪細胞は、外来性または内因性脂質抗原の両方を CD1d 拘束性に提示し、NKT 細胞を活性化することができる。これは、Huh ら、Rakhshandehroo らの報告と一致している[25, 26]。3T3-L1 細胞は、成熟脂肪細胞に分化するにつれて CD1d の発現量が増加し、生体内でも脂肪細胞にその発現が認められる。また、共刺激分子である CD86 は陰性であるが、CD80 の発現は認められた。iNKT 細胞や vNKT 細胞（Jα18$^{-/-}$マウス由来）は、外来抗原なしでも 3T3-L1 脂肪細胞に反応できるが、3T3-L1 脂肪細胞はα-GlyCer/CD1d 複合体を認識する L363 抗体では染色されなかった[27]。つまり、発現量が低すぎるためにフローサイトメーターでは同定できなかっただけかもしれないが、3T3-L1 脂肪細胞はα-GlyCer を提示しておらず、代わりに L363 抗体では認識できない別の抗原が提示されている可能性が考えられる。Rakhshandehroo らは、3T3-L1 脂肪細胞による iNKT 細胞の活性化には、成熟脂肪細胞に発現している MTP-B（ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質）が必要であることを示していることから、この内因性抗原は脂肪細胞で合成される何らかの脂質抗原であると思われる[26]。

生体内での NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用の役割を調べると、この相互作用は肥満の進展に必要であることが本研究で判明した。すなわち、脂肪細胞特異的に CD1d を欠損させると、脂肪細胞による NKT 細胞の活性化が起こらなくなり、脂肪組織炎症が抑制され、結果として、肥満やインスリン感受性が改善した。先行研究では、CD1d$^{-/-}$マウスは HFD 給餌による体重増加やインスリン抵抗性が WT マウスに比べて改善することを示している[18]。本研究では、脂肪細胞選択的に CD1d を欠損させても全身での欠損の場合と同等の結果が得られ、肥満・脂肪組織炎症の誘導において、CD1d を発現している細胞として脂肪細胞が最も重要であることが示唆された。

Jα18$^{-/-}$マウスの NKT 細胞（vNKT 細胞を含む）は、3T3-L1 脂肪細胞と共培養すると IFN-γを有意に産生した（Fig. 4b）。加えて、脂肪組織中 NKT 細胞は、脾臓や肝臓のものに比べて Th1 サイトカインを産生しやすいことも確認している。他の報告によると、脂肪組織中の iNKT 細胞は IL-10 を産生するような抑制性の細胞であり（iNKT10）[28, 29]、脂肪組織特異的な NKT 細胞サブセット（atNKT）であることが示されている。iNKT 細胞が肥満関連炎症において有益な役割を果たすことを示している研究では、HFD 給餌による Jα18$^{-/-}$マウスの体重増加は WT マウスよりも有意に多いと報告されている[15, 16, 25]。これらの研究結果が異なる理由は未だ明らかとなっていない。

HFD 給餌マウスの脂肪組織には IFN-γを産生する NKT 細胞と NK 細胞が集積する。3T3-L1 脂肪細胞において、IFN-γは STAT1 依存的に *Cd1d1* や *Ccl2* の発現

を増加させ、*Adipoq* の発現を減少させることから、IFN-γは脂肪組織で炎症促進の役割を果たしていると考えられる。他の報告からも、ヒト SGBS 脂肪細胞において、IFN-γはインスリン受容体や IRS-1、GLUT4 をダウンレギュレートさせることがわかっている [30]。IFN-γ欠損マウスは、低脂肪食給餌においても体重増加や耐糖能、肝臓のインスリン感受性が改善することが報告されている [31]。さらに、IFN-γ欠損は、TNF-αや CCL2、RANTES の発現を下げることで脂肪組織への細胞浸潤を制御することが知られている [32]。このことから、NKT 細胞から産生された IFN-γは肥満の進展における重要分子であり、その産生は iNKT 細胞や vNKT 細胞とその下流の NK 細胞による寄与が大きく、脂肪細胞の CD1d を介した抗原提示にコントロールされている。本研究とは対照的に、Wensveen らは、NK 細胞上の受容体 NCR1 と脂肪細胞上のそのリガンドによって NK 細胞が活性化され、産生された IFN-γが M1 マクロファージを誘導することで脂肪組織炎症とインスリン抵抗性を増強すると報告している [33]。Lee らもまた、脂肪組織 NK 細胞はマクロファージおよび脂肪細胞の機能を制御することを示している [34]。これらの報告から、脂肪組織 NK 細胞も脂肪組織における免疫バランスを調節する細胞の一つであると考えられる。

マクロファージは肥満における脂肪組織の慢性炎症に密接に関係しており、CCL2/CCR2 シグナリングによって脂肪組織にリクルートされる [35]。我々の知見から、KO マウスはコントロールマウスに比べて CCL2 の発現減少が認められ、マクロファージのリクルートが 78.3%減少しており、これは NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用が肥満脂肪組織へのマクロファージの集積に重要であることを示している（Fig. 11d）。M2 マクロファージ（抗炎症性）は、IL-10 や CD206、arginase1 を発現しており、正常の組織中マクロファージの多くを占め、一方で M1 マクロファージ（炎症性）は、TNF-αや IL-6、iNOS を発現し、炎症組織において優位となる [36]。本研究では、KO マウスとコントロールマウス間でマクロファージの明確な M1/M2 偏倚は認められなかった。これは、HFD 給餌期間が 8 週間と他の報告の 12 週間に比べて短く、マクロファージの偏倚には不十分であったためと考えている [4, 33]。それゆえ、脂肪細胞選択的 CD1d 欠損は、マクロファージの完全な偏倚を来す前に肥満を抑制していると考えられる。

これまでに、全身 [18, 19] または脂肪細胞特異的に CD1d を欠損させると肥満の進展が抑制されることを報告したが、他の研究グループは、iNKT 細胞は IL-4 や IL-10 を産生して M2 マクロファージを誘導するため、CD1d 欠損は肥満を促進すると報告している [15-17]。これらの研究結果の違いには、マウスの系統、高脂肪食の種類（脂質成分の違い）、腸内細菌叢の違い（動物飼育施設の違い）などいくつかの理由が考えられる。具体的には、我々は牛脂と紅花油を主成分とした高脂肪食を使用しているが、他の研究室ではラードや大豆油を主成分とした

ものを使用している。脂肪細胞中の NKT 細胞に対する内因性抗原は、これらの食餌由来の脂質成分に大きく影響されるために、NKT 細胞の機能にも違いが生じるのではないかと考えられる。いずれにしても、この研究結果が異なる理由を明らかにするためにはさらなる解析が必要である。

本研究では、NKT 細胞と脂肪細胞との直接的な相互作用が脂肪組織における免疫調節に寄与していることを示した。脂肪細胞が発現する NKT 細胞の内因性抗原と脂肪組織 NKT 細胞の活性化の制御は、肥満やメタボリックシンドロームのようなさまざまな脂質代謝関連疾患に対する新しい治療・予防アプローチとして役立つと考えている。

総括および結論

- 3T3-L1 脂肪細胞は、CD1d と CD80 を発現し、iNKT 細胞および vNKT 細胞に内因性抗原を提示して活性化することができる。
- IFN-γは 3T3-L1 脂肪細胞を刺激し、*Cd1d1* や *Ccl2* の発現を増加させ、*Adipoq* の発現を減少させる。
- 脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスは、食餌誘導性肥満に抵抗性である。
- 脂肪細胞特異的 CD1d 欠損マウスは、NKT 細胞の活性化、マクロファージの脂肪組織への浸潤が少なく、脂肪組織炎症が抑制される。

本研究から以上の新知見が得られ、脂肪細胞と NKT 細胞との直接的な相互作用が、脂肪組織における免疫応答の調節に重要であることが明らかとなった（図12）。脂肪細胞はもはや単なるエネルギーの貯蔵庫ではなく、生理活性物質を分泌し、免疫系を調節する重要な細胞として考えられている。近年、脂肪組織炎症とさまざまな免疫細胞との関連を示す論文が増えているが、脂肪細胞との直接的相互作用に着目しているものは少なく、今後、この領域の研究が発展していくことが期待される。

NKT 細胞と脂肪細胞の相互作用において、未だ明らかとなっていないことの１つは、脂肪細胞が発現する内因性抗原である。L363 抗体の染色が陰性であることから、α-GlyCer は発現していないことが示唆されるが、フローサイトメトリー解析の結果だけでは不十分である。内因性抗原の探索には、種々の脂質合成阻害剤を用いて NKT 細胞の活性化に影響を及ぼす代謝経路と候補を絞り込み CD1d 分子からの脂質の分離、質量分析による解析・同定などが必要と考えられる。NKT 細胞の内因性抗原が同定できれば、その脂質抗原の阻害等により、NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用をブロックでき、脂肪組織における免疫・炎症応答を抑制することが可能であると考えられる。将来的には、肥満や脂質代謝異常関連疾患の新たな治療・予防ターゲットとなり得ることを期待する。

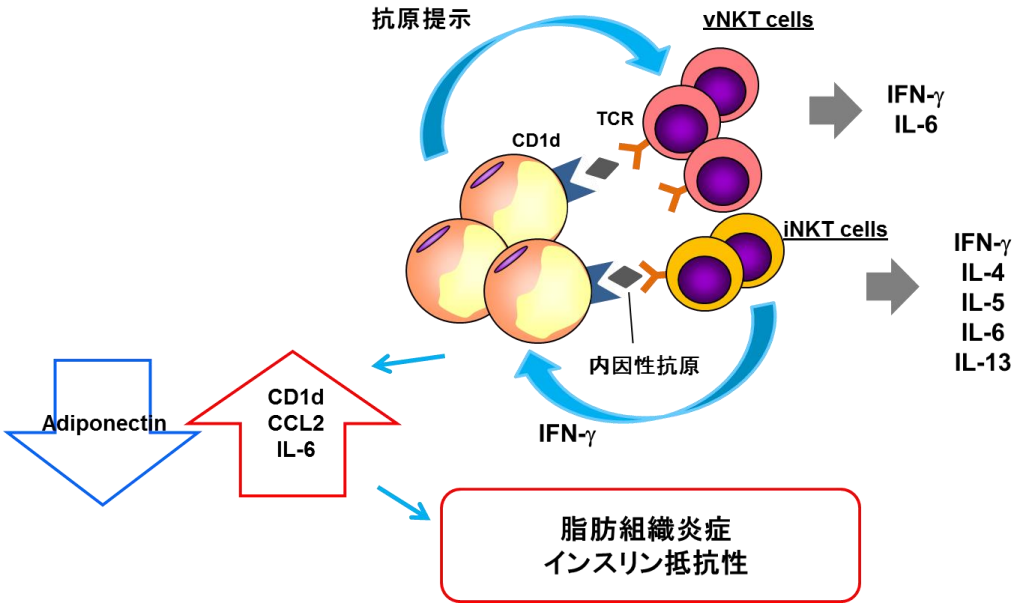

図１２. NKT 細胞―脂肪細胞の相互作用モデル図

脂肪細胞は、CD1d を介して内因性抗原を iNKT 細胞と vNKT 細胞に提示し、活性化させる。iNKT 細胞は、IFN-γや IL-4 など多様なサイトカインを、vNKT 細胞は IFN-γや IL-6 と限定されたサイトカインを産生する。IFN-γは、脂肪細胞に作用し、CD1d や CCL2 などの発現を増加させ、一方 adiponectin の発現を減少させる。このような脂肪細胞の機能修飾により、脂肪組織炎症・インスリン抵抗性が誘導される。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました北里大学医学部免疫学　岩渕和也教授に心から感謝いたします。また、貴重なご助言、ご協力を賜りました北里大学医学部免疫学の皆さまに深く感謝いたします。

本学位申請にあたり、紹介教員を引き受けてくださった北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野　笠原正典教授に深く感謝いたします。

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（若手研究 B）（#25870708）、北里大学医学部けやき会研究助成金、BioLegend/Tomy Digital Biology Research Grant の助成を頂きました。

また、α-GalCer (PBS-57)-loaded CD1d tetramer は、The NIH Tetramer Core Facility (contract HHSN272201300006C)から提供して頂きました。

最後に、本研究の遂行に限らず、私の研究生活の中でお世話になった方々に重ねて御礼申し上げます。

引用文献

1. Brestoff, J. R. & Artis, D. Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell* 161, 146-160 (2015).
2. Wensveen, F. M., Valentić, S., Šestan, M., Turk, Wensveen, T., Polić, B. The "Big Bang" in obese fat: events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur. J. Immunol*. 45, 2446-2456 (2015).
3. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 9, 367-377 (2008).
4. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W. Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest*. 112, 1796-1808 (2003).
5. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., Nagai, R. $CD8^+$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med*. 15, 914-920 (2009).
6. Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A. B., Benoist, C., Shoelson, S., Mathis, D. 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).
7. Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M. G., Alonso, M. N., Leong, H. X., Glassford, A., Caimol, M., Kenkel, J. A., Tedder, T. F., McLaughlin, T., Miklos, D. B., Dosch, H. M., Engleman, E. G. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med*. 17, 610-617 (2011).
8. Wu, D., Molofsky, A. B., Liang, H. E., Ricardo-Gonzalez, R. R., Jouihan, H. A., Bando, J. K., Chawla, A., Locksley, R. M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332, 243-247 (2011).
9. Van, Kaer, L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 354–364 (2007).
10. Salio, M., Silk, J. D., Jones, E. Y. & Cerundolo, V. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annu. Rev. Immunol*. 32, 323-366 (2014).
11. Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M. CD1d-restricted and

TCR-mediated activation of Va14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626–1629 (1997).

12. Halder, R. C., Aguilera, C., Maricic, I. & Kumar, V. Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J. Clin. Invest*. 117, 2302-2312 (2007).
13. Caspar-Bauguil, S., Cousin, B., Galinier, A., Segafredo, C., Nibbelink, M., André, M., Casteilla, L., Pénicaud, L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett*. 579, 3487-3492 (2005).
14. Mantell, B. S., Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Dedousis, N., Sipula, I. J., O'Doherty, R. M. Mice lacking NKT cells but with a complete complement of CD8+ T-cells are not protected against the metabolic abnormalities of diet-induced obesity. *PLoS One* 6, e19831 (2011).
15. Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A. E., Toxavidis, V., Balk, S. P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., Exley, M. A. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37, 574-587 (2012).
16. Schipper, H. S., Rakhshandehroo, M., van, de, Graaf, S. F., Venken, K., Koppen, A., Stienstra, R., Prop, S., Meerding, J., Hamers, N., Besra, G., Boon, L., Nieuwenhuis, E. E., Elewaut, D., Prakken, B., Kersten, S., Boes, M., Kalkhoven, E. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *J. Clin. Invest*. 122, 3343-3354 (2012).
17. Ji, Y., Sun, S., Xu, A., Bhargava, P., Yang, L., Lam, K. S., Gao, B., Lee, C. H., Kersten, S., Qi, L. Activation of natural killer T cells promotes M2 Macrophage polarization in adipose tissue and improves systemic glucose tolerance via interleukin-4 (IL-4)/STAT6 protein signaling axis in obesity. *J. Biol. Chem*. 287, 13561-13571 (2012).
18. Satoh, M., Andoh, Y., Clingan, C. S., Ogura, H., Fujii, S., Eshima, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Hirata, N., Ishimori, N., Tsutsui, H., Onoé, K., Iwabuchi, K. Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* 7, e30568 (2012).
19. Wu, L., Parekh, V. V., Gabriel, C. L., Bracy, D. P., Marks-Shulman, P. A., Tamboli, R. A., Kim, S., Mendez-Fernandez, Y. V., Besra, G. S., Lomenick, J. P., Williams, B., Wasserman, D. H., Van, Kaer, L. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 109, E1143-1152 (2012).
20. Wang, Z. V., Deng, Y., Wang, Q. A., Sun, K., Scherer, P. E. Identification and

characterization of a promoter cassette conferring adipocyte-specific gene expression. *Endocrinology* 151, 2933-2939 (2010).

21. Bai, L., Constantinides, M. G., Thomas, S. Y., Reboulet, R., Meng, F., Koentgen, F., Teyton, L., Savage, P. B., Bendelac, A. Distinct APCs explain the cytokine bias of α-galactosylceramide variants in vivo. *J. Immunol*. 188, 3053-3061 (2012).
22. Mendiratta, S. K., Martin, W. D., Hong, S., Boesteanu, A., Joyce, S., Van, Kaer, L. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6, 469-477 (1997).
23. Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., Taniguchi, M. Requirement for Vα14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626 (1997).
24. Kain, L., Webb, B., Anderson, B. L., Deng, S., Holt, M., Costanzo, A., Zhao, M., Self, K., Teyton, A., Everett, C., Kronenberg, M., Zajonc, D. M., Bendelac, A., Savage, P. B. Teyton, L. The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian α-linked glycosylceramides. *Immunity* 41, 543-554 (2014).
25. Huh, J. Y., Kim, J. I., Park, Y. J., Hwang, I. J., Lee, Y. S., Sohn, J. H., Lee, S. K., Alfadda, A. A., Kim, S. S., Choi, S. H., Lee, D. S., Park, S. H., Seong, R. H., Choi, C. S., Kim, J. B. A novel function of adipocytes in lipid antigen presentation to iNKT cells. *Mol. Cell. Biol*. 33, 328-339 (2013).
26. Rakhshandehroo, M., Gijzel, S. M., Siersbæk, R., Broekema, M. F., de, Haar, C., Schipper, H. S., Boes, M., Mandrup, S., Kalkhoven, E. CD1d-mediated presentation of endogenous lipid antigens by adipocytes requires microsomal triglyceride transfer protein. *J. Biol. Chem*. 289, 22128-22139 (2014).
27. Yu, E. D., Girardi, E., Wang, J., Mac, T. T., Yu, K. O., Van, Calenbergh, S., Porcelli, S. A., Zajonc, D. M. Structural basis for the recognition of C20:2-αGalCer by the invariant natural killer T cell receptor-like antibody L363. *J. Biol. Chem*. 287, 1269-1278 (2012).
28. Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P. J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E. E., Tighe, M., Koay, H. F., Godfrey, D. I., Leadbetter, E. A., Sant'Angelo, D. B., von, Andrian, U., Brenner, M. B. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat. Immunol*. 16, 85-95 (2015).
29. Sag, D., Krause, P., Hedrick, C. C., Kronenberg, M., Wingender, G. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *J. Clin. Invest*. 124, 3725-3740 (2014).

30. McGillicuddy, F. C., Chiquoine, E. H., Hinkle, C. C., Kim, R. J., Shah, R., Roche, H. M., Smyth, E. M., Reilly, M. P. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway. *J. Biol. Chem*. 284, 31936-31944 (2009).
31. Wong, N., Fam, B. C., Cempako, G. R., Steinberg, G. R., Walder, K., Kay, T. W., Proietto, J., Andrikopoulos, S. Deficiency in interferon-gamma results in reduced body weight and better glucose tolerance in mice. *Endocrinology* 152, 3690-3699 (2011).
32. Rocha, V. Z., Folco, E. J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A. H., Libby, P. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ. Res*. 103, 467-476 (2008).
33. Wensveen, F. M., Jelenčić, V., Valentić, S., Šestan, M., Wensveen, T. T., Theurich, S., Glasner, A., Mendrila, D., Štimac, D., Wunderlich, F. T., Brüning, J. C., Mandelboim, O., Polić, B. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat. Immunol*. 16, 376-385 (2015).
34. Lee, B. C., Kim, M. S., Pae, M., Yamamoto, Y., Eberlé, D., Shimada, T., Kamei, N., Park, H. S., Sasorith, S., Woo, J. R., You, J., Mosher, W., Brady, H. J., Shoelson, S. E., Lee, J. Adipose natural killer cells regulate adipose tissue macrophages to promote insulin resistance in obesity. *Cell Metab.* 23, 685-698 (2016).
35. Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., Ferrante, A. W. Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest*. 116, 115-124 (2006).
36. Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A. & Khan, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm. Res*. 65, 1-11 (2016).