

# 肥満における免疫機能および熱ショックタンパク質の解析

2019.3

日本女子大学大学院  
人間生活学研究科人間発達学専攻（博士課程後期）

藤本絵香

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 序論.....   | 1  |
| 第1章 肥満における免疫系変化のメカニズム：熱ショック応答の視点からの検討                                       |    |
| [研究1]   |    |
| 1. 緒言.....  | 3  |
| 2. 実験方法.....  | 4  |
| 2-1. 実験動物   |    |
| 2-2. 実験プロトコール   |    |
| 2-3. 血液生化学検査  |    |
| 2-4. 細胞浮遊液の調製   |    |
| 2-5. フローサイトメトリー解析   |    |
| 2-6. 脾臓リンパ球幼若化反応  |    |
| 2-7. 胸腺細胞における熱ショック実験  |    |
| 2-8. 脾細胞における熱ショック実験   |    |
| 2-9. 細胞内 HSP70 タンパク質レベル   |    |
| 2-10. 統計解析  |    |
| 3. 結果.....  | 8  |
| 3-1. 肥満モデルマウスの特徴  |    |
| 3-2. 肥満および熱ショックが胸腺細胞のアポトーシスに及ぼす影響   |    |
| 3-3. 胸腺細胞における HSP70 タンパク質レベル  |    |
| 3-4. 脾細胞における HSP70 タンパク質レベル   |    |
| 3-5. 肥満および熱ショックが脾細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響  |    |
| 4. 考察.....  | 10 |
| 5. 要旨.....  | 14 |
| 図表.....   | 15 |
| 第2章 肥満の脂肪組織および免疫細胞における解析：サイトカイン、熱ショックタンパク質ならびに免疫栄養素についての検討 [研究2 および3] ..... | 24 |
| 肥満モデルマウスにおける脂肪組織および免疫細胞の検討 [研究2]  |    |
| 1. 緒言.....  | 26 |
| 2. 実験方法.....  | 26 |

|  |    |
|--|----|
| 2-1. 実験動物                                    |    |
| 2-2. 実験プロトコール                                |    |
| 2-3. 臓器重量                                    |    |
| 2-4. 血液生化学検査                                 |    |
| 2-5. フローサイトメトリー解析                            |    |
| 2-6. 脾細胞培養実験                                 |    |
| 2-7. 脂肪組織の培養実験                               |    |
| 2-8. HSP70 タンパク質レベル                          |    |
| 2-9. 肝臓中トリグリセリドレベル                           |    |
| 2-10. 統計解析                                   |    |
| 3. 結果.....                                   | 30 |
| 3-1. 高脂肪食摂取マウスの特徴                            |    |
| 3-2. 高脂肪食摂取マウスのサイトカインレベル                     |    |
| 3-3. 高脂肪食摂取マウスの HSP70 タンパク質レベル               |    |
| 3-4. グルタミン摂取が高脂肪食摂取マウスに及ぼす影響                 |    |
| 3-5. グルタミン摂取が高脂肪食摂取マウスのサイトカインレベルに及ぼす影響       |    |
| 3-6. グルタミン摂取が高脂肪食摂取マウスの HSP70 タンパク質レベルに及ぼす影響 |    |
| 3-7. 肝臓中トリグリセリドおよび HSP70 タンパク質レベル            |    |
| 4. 考察.....                                   | 32 |
| 5. 要旨.....                                   | 35 |
| 図表.....                                      | 36 |
| 肥満モデルマウスの脂肪組織培養における検討 [研究 3]                 |    |
| 1. 緒言.....                                   | 44 |
| 2. 実験方法.....                                 | 44 |
| 2-1. 実験動物および実験プロトコール                         |    |
| 2-2. 血液生化学検査                                 |    |
| 2-3. 脂肪組織の培養実験                               |    |
| 2-4. HSP70 タンパク質レベル                          |    |
| 2-5. 統計解析                                    |    |
| 3. 結果.....                                   | 47 |
| 3-1. 体重、脂肪重量および血液生化学検査                       |    |

|  |           |
|--|-----------|
| 3-2. 脂肪組織培養上清中サイトカイン濃度                         |           |
| 3-3. 脂肪組織 HSP70 タンパク質レベル                       |           |
| 4. 考察.....                                     | 48        |
| 5. 要旨.....                                     | 50        |
| 図表.....  | 51        |
| <b>第3章 2型糖尿病の免疫機能および熱ショックタンパク質における免疫栄養素の影響</b> |           |
| <b>[研究4]</b>                                   |           |
| 1. 緒言.....                                     | 55        |
| 2. 実験方法.....                                   | 56        |
| 2-1. 実験動物                                      |           |
| 2-2. 実験プロトコール                                  |           |
| 2-3. 臓器重量                                      |           |
| 2-4. 血液生化学検査                                   |           |
| 2-5. 脾臓単核球培養実験                                 |           |
| 2-6. HSP70 タンパク質レベル                            |           |
| 2-7. 統計解析                                      |           |
| 3. 結果.....                                     | 59        |
| 3-1. 2型糖尿病型モデルマウスの誘導                           |           |
| 3-2. 実験食摂取量                                    |           |
| 3-3. 体重および臓器重量                                 |           |
| 3-4. 血液生化学検査                                   |           |
| 3-5. 脾臓単核球培養実験                                 |           |
| 3-6. HSP70 タンパク質レベル                            |           |
| 4. 考察.....                                     | 61        |
| 5. 要旨.....                                     | 64        |
| 図表.....  | 65        |
| <b>総括.....</b>                                 | <b>73</b> |
| <b>Summary.....</b>                            | <b>75</b> |
| <b>参考文献.....</b>                               | <b>78</b> |
| <b>謝辞.....</b>                                 | <b>88</b> |



## 序論

肥満は世界的に増加しており、1975 年から 2016 年の統計時まで約 3 倍に増加している<sup>1)</sup>。日本においても肥満者の割合は依然として高く、平成 29 年国民健康・栄養調査報告によると、成人における肥満者の割合は男性で 30.7%、女性で 21.9%であった<sup>2)</sup>。肥満は 2 型糖尿病、動脈硬化性疾患、がん等に加え、感染症、アレルギー性疾患、ワクチン不全等、種々の病態と関連づけられてきている<sup>3,4)</sup>。さらに、これらの病態の基盤として、肥満における T 細胞の数的・機能的変化に加え、脂肪細胞と免疫細胞の相互作用により進展、維持される脂肪組織の慢性炎症性変化など、免疫機能の変化や炎症といった免疫系における変化が示されてきている<sup>3,4)</sup>。したがって、肥満を基盤とした種々の病態を明らかにし、さらにその予防法および改善法を検討するために、肥満における免疫系変化の機序を解明することが望まれる。

免疫系への関与が示されている生体因子の一つとして、熱ショックタンパク質 (Heat shock protein ; HSP) が挙げられる。HSP は進化の過程で高度に保存されたタンパク質であり、熱ショックを含む様々な細胞ストレス時において変性タンパク質の構造回復や分解促進等に関与することによりタンパク質の恒常性を維持し、生命機能維持に重要な役割を果たす<sup>5,7)</sup>。HSP ファミリーは分子量に基づく分類によって主に HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、低分子 HSP に分類される<sup>8)</sup>。各 HSP について、タンパク質の恒常性維持に加え、細胞内シグナル伝達への関与、抗アポトーシス作用等が明らかにされてきている<sup>9)</sup>。肥満および 2 型糖尿病においては、骨格筋等の種々の臓器・組織における HSP 発現の変化<sup>10-12)</sup>が示され、温熱処置や HSP 発現の誘導によるインスリン抵抗性の抑制<sup>10,13)</sup>等、肥満に関連した病態と HSP との関連が示唆されてきている。哺乳類における分子量 70kD の HSP70 ファミリーは、細胞質や核に局在するストレス誘導性の HSP70 (HSP72 と呼ばれる)、恒常的に発現する HSC70 (heat shock cognate protein ; HSP73 と呼ばれる) などから構成される<sup>14)</sup>。HSP70 は、肥満における病態との関連が示されてきている HSP の 1 つであり、さらにタンパク質の恒常性維持に加え、サイトカイン発現への影響<sup>8)</sup>、NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) 活性化の阻害による抗炎症作用<sup>15)</sup>、抗アポトーシス作用<sup>16)</sup>などが示されている。本研究では、肥満における免疫系変化の機序について、熱ショックタンパク質、特に HSP70 の観点から検討を行った。

また一方で、種々の栄養素や食品成分の免疫機能への作用、ならびに免疫系を介した病態との関連について示されてきており<sup>17)</sup>、免疫機能に影響を及ぼし得るアルギニン、グル

タミン、**n-3** 系脂肪酸等を投与することにより免疫機能および炎症状態を改善する免疫栄養療法についての検討もなされてきている<sup>18,19)</sup>。肥満においては、**n-3** 系脂肪酸や抗酸化物質による抗炎症効果等が検討されてきているが<sup>20)</sup>、免疫系に作用し得る栄養素と肥満の病態との関連についての検討はいまだ十分ではなく、肥満における免疫系変化の機序の解明ならびに肥満に関連した病態の予防法および改善法の開発のためにさらなる検討が望まれる。

本研究は、肥満に関連する病態の免疫系変化について、肥満モデルマウスおよび2型糖尿病型モデルマウスにおいて免疫系および**HSP**に着目し検討を行った。さらに、免疫系に作用し得る栄養素（以下、免疫栄養素とする）が及ぼす影響について検討した。本研究は以下の3章〔研究1－4〕で構成される。

#### 第1章〔研究1〕：肥満における免疫系変化のメカニズム：熱ショック応答の視点からの検討

肥満における免疫細胞の変化と**HSP**との関連について検討するため、肥満モデルマウス由来の胸腺細胞および脾細胞の培養系において *in vitro*での熱ショックが胸腺細胞および脾細胞に及ぼす影響を検討した<sup>21)</sup>。

#### 第2章〔研究2および3〕：肥満の脂肪組織および免疫細胞における解析：サイトカイン、熱ショックタンパク質ならびに免疫栄養素についての検討

肥満の免疫機能および**HSP70**について脂肪組織にも注目し解析した。さらに、免疫系および**HSP**発現に関与するアミノ酸であるグルタミンが及ぼす影響について検討を行った。本章は、研究2「肥満モデルマウスにおける脂肪組織および免疫細胞の検討」および研究3「肥満モデルマウスの脂肪組織培養における検討」<sup>22)</sup>で構成される。

#### 第3章〔研究4〕：2型糖尿病の免疫機能および熱ショックタンパク質における免疫栄養素の影響

免疫調節作用を有するアミノ酸であるアルギニンおよびグリシンの摂取が、2型糖尿病型モデルマウスの免疫機能および**HSP70**発現に及ぼす影響について検討した<sup>23)</sup>。

## 第1章 肥満における免疫系変化のメカニズム：熱ショック応答の視点からの検討【研究1】

### 1. 緒言

肥満は、炎症および免疫異常と関連づけられてきている<sup>3)</sup>。肥満における免疫系の変化として、T細胞の分化、成熟に関わる中枢リンパ組織である胸腺の萎縮が加速すること<sup>24,25)</sup>、また末梢においてはT細胞の数、サブセット分布、機能等が炎症惹起性に変化すること<sup>26)</sup>が示されている。胸腺の加齢に伴う萎縮はナイーブT細胞の減少につながり、その結果T細胞の多様性が減少し易感染性やがん等の増加につながる<sup>27)</sup>。先行研究により、この加齢による胸腺退縮が肥満によって加速すること、またこの胸腺退縮は胸腺細胞におけるアポトーシスの増加等と関連することが示されている<sup>25)</sup>。また、肥満における末梢でのT細胞の炎症性変化は、サイトカイン等を介して全身性炎症および脂肪組織炎症に関与する<sup>26)</sup>。

一方、熱ショック応答は熱ショックタンパク質（Heat shock protein；HSP）の誘導を特徴とする進化の過程で高度に保存されたストレス応答である<sup>14,28)</sup>。肥満および2型糖尿病において、種々の臓器・組織でHSP発現が変化していること<sup>10-12,29)</sup>、また温熱処置やHSP70発現の誘導によりインスリン抵抗性が抑制されること<sup>10,13)</sup>が報告されている。熱ショックおよびHSPは、その細胞防御作用に加えてアポトーシス<sup>16)</sup>およびサイトカイン産生<sup>30-32)</sup>にも影響を及ぼし得ることが示されている。

本研究では、肥満における免疫系の変化とHSPとの関連について検討するため、肥満モデルマウス由来の胸腺細胞および脾細胞において*in vitro*での熱ショックが免疫細胞に及ぼす影響、特に胸腺細胞のアポトーシスおよび脾細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 実験動物

実験には5週齢の C57BL/6J 雄マウス（三協ラボサービス）を用いた。マウスは12時間毎の明暗サイクル（消灯時間：午後7時～午前7時）において温度 20～26℃、湿度 30～70%に管理した環境下で飼育した。飼料および蒸留水は自由摂取とした。体重および飼料摂取量を週1回測定した。なお、本研究は日本女子大学動物実験委員会の承認のもと、日本女子大学動物実験規程に従った。

### 2-2. 実験プロトコール

普通食（AIN-93M 標準飼料、Standard diet ; SD）で1週間馴化飼育を行った後、肥満を誘導する肥満群（Obese 群、 $n = 5$ ）および肥満を誘導しない非肥満群（Non-obese 群、 $n = 5$ ）の2群に分けた。肥満群は、普通食においてコーンスターチの一部をラードに置き換え、脂肪エネルギー比率を60%とした高脂肪食（High fat diet ; HFD）を摂取させることにより食餌誘導性肥満モデルマウスを誘導した。非肥満群は普通食を摂取させた。実験飼料の組成を Table1-1 に示す。なお、高脂肪食により誘導される食餌誘導性肥満モデルマウスは、インスリン抵抗性を呈するなどヒト肥満の特徴を多く反映することが確認されている<sup>33)</sup>。それぞれの食餌で7週間飼育した後、一晚絶食をさせて尾静脈より空腹時採血を行った。各食餌での8週間の飼育の後に解剖を行った。皮下脂肪（鼠径部脂肪）および内臓脂肪（精巣上体脂肪）の重量を測定した。下記の方法によって胸腺および脾臓より細胞浮遊液を調製し、フローサイトメトリーによるリンパ球サブセット解析およびアポトーシス解析、リンパ球幼若化反応の測定ならびに熱ショック実験に供した。

### 2-3. 血液生化学検査

空腹時採血した血液において、小型血糖測定器グルコカードダイアメーター $\alpha$ （アークレイファクトリー）を用いて血糖値を測定した。血液をヘパリン処理済みガラス毛细管に採取し、遠心分離により得た血漿を解析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。血漿インスリン濃度をレビスインスリン測定用 ELISA キット（シバヤギ）を用いて測定した。インスリン抵抗性の指標として Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) を以下の式により算出した：

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹時インスリン値} (\mu\text{U/ml}) \times \text{空腹時血糖値} (\text{mg/dl}) / 405$$

#### 2-4. 細胞浮遊液の調製

胸腺および脾臓を RPMI1640 培地（日水製薬）に浸し、ステンレスメッシュ（200 メッシュ）にて細胞を遊出させた。23G 注射針を付けたシリンジでピペッティングした後、細胞浮遊液をナイロンメッシュ（200 メッシュ）に通した。細胞浮遊液を RPMI1640 培地で 2 回、5 %FBS 含有 RPMI1640 培地で 1 回遠心分離し（4℃、1,200rpm、10 分間）、細胞を 5 %FBS 含有 RPMI1640 培地に浮遊させた。細胞浮遊液の一部にトリパンブルー溶液（Wako）を添加し、血球計算盤を用いて細胞数をカウントした。

#### 2-5. フローサイトメトリー解析

胸腺細胞および脾細胞の細胞浮遊液を遠心分離し（4℃、1400rpm、5 分間）、溶血剤（0.83% NH<sub>4</sub>Cl-Tris buffer (pH 7.2)）により溶血した。2 %FBS 含有 PBS に浮遊させ下記の蛍光標識抗体 1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> cells を添加し、30 分間氷上、遮光にて蛍光標識抗体と反応させた。Gallios フローサイトメーター（Beckman Coulter）により測定し、Kaluza ソフトウェア（Beckman Coulter）を用いてリンパ球集団における細胞比率を解析した。胸腺細胞および脾細胞を Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD4 抗体および Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD8 抗体で染色した。また、脾細胞を FITC 標識抗 CD3 抗体（T 細胞マーカー）、ならびに Peridinin chlorophyll protein (PerCP) 標識抗 CD4 抗体、FITC 標識抗 CD45RB 抗体、および PE 標識抗 CD44 抗体（ナイーブおよびエフェクター／メモリーのマーカー）で染色した（BD Biosciences）。胸腺細胞におけるアポトーシス細胞の解析は、Annexin V-FITC アポトーシス検出キット（BioVision）を用いて Annexin V および Propidium iodide (PI) で染色することにより行った。

#### 2-6. 脾臓リンパ球幼若化反応

脾細胞を 96 穴平底プレート中  $5 \times 10^4$  cells/well で播種し、5  $\mu$ g/ml Concanavalin A (ConA, Sigma) の存在下で 37℃、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 48 時間培養した後、Alamar Blue 法により T 細胞マイトジェン刺激下でのリンパ球幼若化反応を測定した<sup>34)</sup>。Alamar Blue (Bio-Rad) を 10  $\mu$ l/well 添加し、さらに 4 時間培養した後に 544/590nm で蛍光強度を測定し、Stimulation Index (SI ; 下式) として評価した：

Stimulation Index = ConA 刺激下での蛍光強度／無刺激下での蛍光強度

## 2-7. 胸腺細胞における熱ショック実験

胸腺細胞を 24 穴平底プレート中  $5 \times 10^6$  cells/well で播種し、 $42^\circ\text{C}$  に設定した 5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーター中に 0.5 時間置くことにより熱ショックを加えた (+HS 群)。一方で、対照群としての熱ショックを加えない群は  $37^\circ\text{C}$  に置いた (No HS 群)。その後、両群のプレートを  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて一晩培養した。

培養後、各ウェルの細胞浮遊液を 1.5ml チューブに回収し、各細胞浮遊液の一部を 2-5 に記載するフローサイトメトリー法によるアポトーシス細胞の解析に供した。遠心分離 ( $4^\circ\text{C}$ 、3,000rpm、10 分間) によって、残りの細胞浮遊液を胸腺細胞および培養上清に分離した。回収した細胞および培養上清は、解析までそれぞれ  $-80^\circ\text{C}$  および  $-30^\circ\text{C}$  で保存した。培養上清中の HSP70 濃度を Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC kit (R&D Systems) を用いて ELISA 法により測定し、胸腺細胞から分泌される細胞外 HSP70 タンパク質レベルを評価した。回収した胸腺細胞の細胞内 HSP70 タンパク質レベルを 2-9 に示す方法により測定した。

## 2-8. 脾細胞における熱ショック実験

脾細胞を 24 穴平底プレート中  $5 \times 10^6$  cells/well で播種し、 $42^\circ\text{C}$  に設定した 5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーター中に 1 時間置くことにより熱ショックを加えた (+HS 群)。一方で、対照群としての熱ショックを加えない群は  $37^\circ\text{C}$  に置いた (No HS 群)。その後、両群のプレートを  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーターに 1 時間置き、さらに ConA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) の存在下または非存在下にて 24 時間培養した。培養後、遠心分離 ( $4^\circ\text{C}$ 、3,000rpm、10 分間) によって脾細胞および培養上清に分離した。回収した細胞および培養上清は、解析までそれぞれ  $-80^\circ\text{C}$  および  $-30^\circ\text{C}$  で保存した。細胞内 HSP70 タンパク質レベルおよび細胞外 HSP70 タンパク質レベルは、ConA 添加なしのウェルから回収した脾細胞および培養上清において 2-7 と同様に評価した。ConA 刺激下での脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度を DuoSet kit (R&D Systems) を用いて ELISA 法によって測定した。測定したサイトカインは Interferon (IFN)  $-\gamma$ 、Interleukin (IL)  $-4$ 、IL-17 および IL-10 であった。

## 2-9. 細胞内 HSP70 タンパク質レベル

回収した細胞を、プロテアーゼ阻害剤 (complete、Roche) を添加した T-PER buffer (Thermo Fisher Scientific) 中でペレットペッスル (Kontes) を用いてホモジナイズし

た。遠心分離（4℃、15,000 rpm、5 分間）によりホモジナイズ上清を得た。

ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を ELISA 法による Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC kit (R&D Systems)、総タンパク質濃度を BCA (Bicinchoninic Acid) 法による BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を総タンパク質濃度で除した値を細胞内 HSP70 タンパク質レベルとした。

## 2-10. 統計解析

結果を平均値±標準誤差として示す。肥満群と非肥満群の 2 群間比較は対応のない t 検定により行った。熱ショック実験の結果の解析は、肥満と熱ショックの 2 要因による二元配置分散分析を行い、交互作用が有意であった場合には Tukey 検定による多重比較検定を行った。統計学的処理に SPSS Statistics version 23 (IBM) を使用し、有意水準を 5 % とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 肥満モデルマウスの特徴

本研究の高脂肪食により誘導した肥満モデルマウス（肥満群）は、体重および脂肪重量が非肥満群と比較して有意に高値であった（Table 1-2）。解剖の1週間前の空腹時採血での血液生化学検査の結果、肥満群は非肥満群と比して血糖値および血漿インスリン濃度が有意に高値であり、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は高値傾向であった（ $P=0.059$ ）。

肥満モデルマウスの胸腺細胞の特徴を Table 1-3 に示す。肥満群と非肥満群は胸腺細胞の総数において有意差はなかった。胸腺はT細胞の分化に重要な役割を果たしており、その分化の過程において CD3 およびT細胞レセプターの発現、CD4、CD8 などの機能分子の発現、CD4 または CD8 いずれか一方の分子を保持するT細胞への分化などによりいくつかの形質が獲得される<sup>35)</sup>。フローサイトメトリー法による CD4/CD8 解析では2群間に有意差はなかった。アポトーシス解析の結果、Annexin V 陽性細胞であるアポトーシス細胞および Annexin V 陰性かつ PI 陽性細胞であるネクローシス細胞の細胞比率が肥満群で高値であった。一方で、Annexin V・PI 両陰性である生存細胞の比率は肥満群で低値であった。

肥満モデルマウスの脾細胞の特徴を Table 1-4 に示す。肥満群と非肥満群の比較において、総細胞数、T細胞比率、CD4/CD8 解析、ナイーブ/エフェクターメモリー解析、T細胞マイトジェン刺激下におけるリンパ球幼若化反応のいずれの項目においても有意差を認めなかった。

#### 3-2. 肥満および熱ショックが胸腺細胞のアポトーシスに及ぼす影響

肥満群および非肥満群の胸腺細胞に対して培養下で熱ショックを与え一晩培養した後のアポトーシス解析の代表的なフローサイトメトリープロファイルを図 1-1A、二元配置分散分析の結果を図 1-1B に示す。二元配置分散分析の結果、生存細胞比率において肥満と熱ショックとの間に有意な交互作用を認めた（Fig. 1-1B(a)）。熱ショックは生存細胞比率を減少させたが、肥満群は非肥満群と比較して熱ショックによる生存細胞比率の低下がより顕著であり、肥満+HS 群の胸腺細胞はすべての群の中で最も生存細胞比率が低かった。アポトーシス細胞比率は、肥満および熱ショックにより有意に高値を示したが、肥満と熱ショックとの間に有意な交互作用は認めなかった（Fig. 1-1B(b)）。ネクローシス細胞比率は、肥満により有意に高値を示したが、熱ショックによるネクローシス細胞比率への



有意な影響はなかった (Fig. 1-1B(c))。

### 3-3. 胸腺細胞における HSP70 タンパク質レベル

胸腺細胞の細胞内および細胞外の HSP70 タンパク質レベルの結果を Fig. 1-2 に示す。細胞内 HSP70 タンパク質レベルは熱ショックにより上昇した (Fig. 1-2(a))。一方で、肥満による有意な影響は認めなかった。細胞外 HSP70 タンパク質レベルもまた熱ショックにより上昇した (Fig. 1-2(b))。肥満と熱ショックとの交互作用の傾向が認められたが ( $P = 0.084$ )、肥満の有意な影響は認めなかった。

### 3-4. 脾細胞における HSP70 タンパク質レベル

脾細胞の細胞内および細胞外 HSP70 タンパク質レベルの結果を Fig. 1-3 に示す。HSP70 タンパク質レベルは、細胞内、細胞外ともに熱ショックにより有意に高値を示したが、肥満による主効果および交互作用において有意な影響は認めなかった。

### 3-5. 肥満および熱ショックが脾細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響

肥満群および非肥満群由来の脾細胞において、T細胞マイトジェン刺激前の熱ショック刺激がサイトカイン産生に及ぼす影響を ConA 刺激下での脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度により評価した (Table 1-5)。肥満群は非肥満群に対して IL-17 濃度および IL-10 濃度が有意に高値であった。熱ショックにより IFN- $\gamma$  濃度および IL-10 濃度は有意に低値を示した。二元配置分散分析による肥満と熱ショックとの有意な交互作用は認めなかった。

#### 4. 考察

本研究では、肥満における免疫系の変化と HSP との関連について検討するため、肥満モデルマウス由来の胸腺細胞および脾細胞において、*in vitro* での熱ショックが胸腺細胞のアポトーシスおよび脾細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

本研究において高脂肪食摂取により誘導した食餌誘導性肥満モデルマウスは、胸腺細胞においてアポトーシス細胞比率およびネクローシス細胞比率が高値であった。先行研究により、加齢による胸腺退縮が肥満によって加速すること、またこの胸腺退縮は胸腺細胞におけるアポトーシスの増加等と関連することが示されている<sup>24,25)</sup>。胸腺退縮はナイーブ T 細胞の減少につながり、その結果 T 細胞の多様性が減少する<sup>27)</sup>。本研究において、統計学的に有意ではないものの、脾細胞におけるナイーブ T 細胞の比率は肥満群が非肥満群に比して低値であった。

胸腺細胞における熱ショック実験の結果から、胸腺細胞に対して熱ショックを加えた場合、生存細胞比率の低下が認められた。さらに、その熱ショックによる生存細胞比率の低下は肥満群の胸腺細胞においてより顕著であり、この生存細胞比率の低下はアポトーシス細胞比率の増加を伴うことが示された。熱ショックは胸腺細胞においてアポトーシスを誘導するが<sup>36)</sup>、一方で抗アポトーシス作用を有する HSP を誘導する<sup>16)</sup>。熱ショックが胸腺細胞の生存に対して及ぼす影響が肥満群と非肥満群とで異なっていたことから、抗アポトーシス作用を有する HSP の発現が両群間で異なる可能性が示唆された。また、本研究や先行研究<sup>24,25)</sup>により示された肥満における胸腺細胞アポトーシスの増加は、本研究により示唆された胸腺細胞における抗アポトーシス作用を有する HSP 発現の低下と関連する可能性が考えられる。

HSP70 は、抗アポトーシス作用を有する HSP の 1 つである<sup>16)</sup>。また、先行研究によりインスリン抵抗性の症例および動物モデルの種々の臓器で HSP70 レベルが低下していることが示されてきており<sup>10-12,29)</sup>、本研究において熱ショックが胸腺細胞の生存に対して及ぼす影響が肥満群と非肥満群とで異なっていたことのメカニズムの 1 つとして肥満による胸腺細胞 HSP70 レベルへの影響が考えられたが、本研究においては胸腺細胞 HSP70 タンパク質レベルは細胞内、細胞外ともに 2 群間に統計学的有意差は認められなかった。ラットを温熱下に置いた後に胸腺におけるアポトーシスおよび HSP を解析した先行研究<sup>37)</sup>において、胸腺の同一切片上で HSP70 陽性細胞とアポトーシス細胞とを細胞レベルで解析した場合、HSP70 単独陽性の細胞とアポトーシスのみ検出された細胞が多く存在する一方で、両陽性細胞はほとんど存在しないことから、組織全体で評価した場合と比較し

て HSP70 誘導とアポトーシス阻害との関連がより明らかにされている。本研究により示された肥満におけるアポトーシス細胞の増加が HSP70 発現の変化と関連する可能性について、細胞レベルでの解析を含めたさらなる検討が求められる。

脾細胞においても細胞内、細胞外ともに肥満による HSP70 タンパク質レベルへの有意な影響を認めなかった。インスリン抵抗性の症例および動物モデルの種々の臓器において HSP70 レベルが低下していることが示されてきており、そのメカニズムの 1 つとしてインスリンシグナル伝達カスケードが阻害されることより熱ショック転写因子 1 (Heat shock transcription factor 1 ; HSF1) の核移行および活性が抑制され HSP の発現が低下することが示されている<sup>31)</sup>。本研究の肥満モデルマウスは HOMA-IR が高値傾向であり、インスリン抵抗性を有すると考えられる。肥満者のリンパ球はインスリン抵抗性を示すことが報告されており<sup>38)</sup>、本研究の肥満モデルマウスにおいてもリンパ球はインスリン抵抗性の状態にある可能性がある。一方で、HSF/HSP 経路は、肥満に関連した酸化ストレス、炎症性メディエーターの増加、細胞傷害などによって活性化される<sup>39)</sup>。肥満者および糖尿病罹患者における先行研究において、肥満者は非肥満者と比較して末梢血単核細胞および脂肪組織の HSP70 レベルが高値である一方で、糖尿病を伴う肥満者では、糖尿病ではない肥満者と比較して脂肪組織 HSP70 レベルが低下していることが示され、糖尿病ではない肥満者においては HSP の誘導能が保たれており肥満に関連した細胞ストレスに対して抗し得る状態であることが示唆された<sup>40)</sup>。以上のことから、本研究において脾細胞の HSP70 レベルは肥満群と非肥満群の間に統計学的有意差を認めなかったが、細胞ストレスに対する HSP70 発現の誘導とともにインスリン抵抗性による HSP70 発現の低下が生じている可能性がある。

T 細胞サブセットはそれぞれ特定のサイトカインプロファイルおよび機能を有する。CD4<sup>+</sup> T 細胞においては、ヘルパー T (T helper ; Th) 1、Th2、Th17、および制御性 T (regulatory T ; Treg) 細胞などのサブセットが明らかになってきている。これら T 細胞サブセットおよびサイトカインのインバランスは種々の免疫疾患と関連づけられてきている<sup>41,42)</sup>。本研究における T 細胞マイトジェン刺激下でのサイトカイン解析の結果において、肥満群は非肥満群と比較して炎症性サイトカインである IL-17 濃度および抗炎症性サイトカインである IL-10 濃度が高値であった。肥満者において、T 細胞の数、サブセット分布、機能が炎症性に変化していることが示されている<sup>26)</sup>。一方で、糖尿病等の合併症を有さない肥満者において、肥満者の末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞が抗炎症性の Treg 型および Th2 型に偏向していることが示されている<sup>43)</sup>。先行研究による肥満モデルマウスにおける検討

では、13 週間の高脂肪食摂取後のマウスにおいて脾臓単核球による Th1 型サイトカイン IFN- $\gamma$  および Th2 型サイトカイン IL-4 産生が増加したこと<sup>44)</sup>、10 週間の高脂肪食を摂取したマウスでは Th17 細胞が増加し、Th1 細胞、Th2 細胞、および Treg 細胞の変化はなかったこと<sup>45)</sup>が報告されている。本研究の肥満モデルマウスにおける炎症性サイトカインである IL-17 産生と抗炎症性サイトカインである IL-10 産生の両方の増加は、肥満マウスにおける炎症状態に加え、炎症状態に抗する状態である可能性がある。このことは、本研究の HSP70 解析の結果において、肥満における細胞ストレスに対して本研究の肥満モデルマウスが HSP70 の誘導能をある程度維持している可能性と一致する。したがって、より重度またはより長期の肥満によっては HSP70 誘導能がさらに低下し、さらなるサイトカイン産生の変化や病態の変化につながる可能性がある。

脾細胞における熱ショック実験において、T細胞マイトジェン刺激前の熱ショックにより IFN- $\gamma$  産生および IL-10 産生が減少することが示された。熱ショックが IFN- $\gamma$  に及ぼす影響については、末梢血単核細胞に対する 39°C、48 時間の熱ショックが IFN- $\gamma$  産生を低減したとの報告や<sup>30)</sup>、一方で末梢血単核細胞に対する 39~41°C、90 分間の熱ショックでは IFN- $\gamma$  産生が増強したとの報告<sup>46)</sup>がある。また、*in vivo*での検討では、41~45°Cの温浴による 39°Cの体温誘導により T細胞サブセットが変化し、IFN- $\gamma$  産生が上昇することが報告されている<sup>47)</sup>。熱ショックによる IL-10 産生への影響を *in vitro* および *in vivo* の系で検討した先行研究では、熱ショックを受けた被験者において血漿中 IL-10 レベルが高値である一方で、LPS 刺激下での単球の IL-10 産生が熱ショックにより減少したことから、*in vitro* と *in vivo* において熱ショックの影響が異なることを示している<sup>48)</sup>。よって、熱ショックが肥満の免疫細胞に及ぼすサイトカイン産生への影響は熱ショックの条件や *in vivo* の系においては異なる可能性があり、熱ショックまたは他の方法による HSP 発現の上昇がサイトカイン産生に及ぼす影響について *in vivo* における検討もまた望まれる。

以上の結果より、熱ショックが胸腺細胞の生存に及ぼす影響が肥満によって変化したことから、肥満における胸腺細胞アポトーシスの増加が熱ショック応答と関連することが示唆された。本研究においては HSP70 レベルと肥満との明らかな関連は認められなかったが、肥満における胸腺細胞のアポトーシスと HSP 発現との関連についてより詳細な検討が求められる。熱ショックの脾細胞サイトカインへの影響の検討では、肥満ならびに熱ショックによってサイトカイン産生が多様に変化することが示された。熱ショック応答と肥満との明らかな関連は見出されなかったが、熱ショック応答の変化がサイトカイン産生の

変化につながることで、病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 5. 要旨

本研究は、肥満における免疫系の変化と **HSP** との関連について検討することを目的として、肥満モデルマウス由来の胸腺細胞および脾細胞に対して *in vitro* での熱ショックが及ぼす影響を解析した。本研究において高脂肪食摂取により誘導した肥満モデルマウス（肥満群）は、肥満を誘導していない非肥満群と比較して胸腺細胞におけるアポトーシス細胞およびネクローシス細胞の細胞比率が高く、またT細胞マイトジェン刺激下での脾細胞によるサイトカイン産生において変化を示した。胸腺細胞に対する熱ショックは生存細胞比率を低下させ、その低下の程度は肥満群においてより顕著であった。胸腺細胞および脾細胞の細胞内および細胞外 **HSP70** レベルにおいて肥満群および非肥満群に有意差は認められなかった。熱ショック刺激は肥満の有無によらずサイトカイン産生を変化させた。以上の結果より、肥満における免疫細胞 **HSP70** レベルの変化ならびにサイトカイン産生と熱ショック応答との明らかな関連は認められなかったが、肥満における胸腺細胞の生存率の低下が肥満による熱ショック応答における変化と関連することが示唆された。また、熱ショック応答の変化がサイトカイン産生を変化させ、病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

**Table 1-1****Diet compositions.**

| Ingredient (g/kg diet)          | SD       | HFD      |
|---------------------------------|----------|----------|
| Casein                          | 140      | 140      |
| Cystine                         | 1.8      | 1.8      |
| Soybean oil                     | 40       | 40       |
| Lard                            | 0        | 290      |
| Cornstarch                      | 465.7    | 175.7    |
| $\alpha$ -Cornstarch            | 155      | 155      |
| Sucrose                         | 100      | 100      |
| Cellulose                       | 50       | 50       |
| AIN-93M mineral mix             | 35       | 35       |
| AIN-93 vitamin mix              | 10       | 10       |
| Choline bitartrate              | 2.5      | 2.5      |
| <i>tert</i> -Butyl hydroquinone | 0.008    | 0.008    |
| Energy (kcal/100g diet)         | 349      | 519      |
| P:F:C (% of energy)             | 15:11:74 | 10:60:30 |

SD, standard diet; HFD, high-fat diet; AIN-93, American Institute of Nutrition-93; P:F:C, protein, fat, and carbohydrate.

**Table 1-2****Animal characteristics**

|                        | Non-obese     | Obese          |
|------------------------|---------------|----------------|
| Body weight (g)        | 32.0 ± 1.2    | 39.8 ± 1.3**   |
| Fat pad weight (g)     |               |                |
| Subcutaneous fat       | 0.21 ± 0.04   | 0.43 ± 0.06*   |
| Epididymal fat         | 1.07 ± 0.15   | 2.39 ± 0.11**  |
| Blood biomarker        |               |                |
| Blood glucose (mg/dl)  | 65 ± 3        | 115 ± 12**     |
| Plasma insulin (ng/ml) | 0.154 ± 0.047 | 0.994 ± 0.288* |
| HOMA-IR                | 0.68 ± 0.23   | 8.13 ± 3.37    |

Values for non-obese mice ( $n = 5$ ) and obese mice ( $n = 5$ ) are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ . Body weights and fat pad weights at 8 weeks of the experimental diet as well as blood biomarkers at 7 weeks of the experimental diet were measured. HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.



**Table 1-3****Thymocyte characteristics**

|                                     | Non-obese       | Obese            |
|-------------------------------------|-----------------|------------------|
| Total cell count ( $\times 10^7$ )  | 7.87 $\pm$ 0.43 | 8.53 $\pm$ 0.65  |
| CD4 and CD8 analysis (%)            |                 |                  |
| CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>   | 81.9 $\pm$ 0.8  | 81.6 $\pm$ 0.5   |
| CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>   | 8.4 $\pm$ 0.8   | 8.6 $\pm$ 0.5    |
| CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>   | 6.7 $\pm$ 0.2   | 6.8 $\pm$ 0.2    |
| CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>   | 3.0 $\pm$ 0.2   | 3.1 $\pm$ 0.2    |
| Apoptosis analysis (%) <sup>a</sup> |                 |                  |
| Live                                | 88.4 $\pm$ 0.6  | 82.0 $\pm$ 0.3** |
| Apoptotic                           | 11.5 $\pm$ 0.6  | 17.8 $\pm$ 0.4** |
| Necrotic                            | 0.05 $\pm$ 0.02 | 0.19 $\pm$ 0.04* |

Values for non-obese mice ( $n = 5$ ) and obese mice ( $n = 5$ ) are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ .

<sup>a</sup> Live (annexin V-PI-); Apoptotic (annexin V+); Necrotic (annexin V-PI+). PI, propidium iodide.

**Table 1-4****Splenocyte characteristics**

|  | Non-obese       | Obese           |
|--|-----------------|-----------------|
| Total cell count ( $\times 10^8$ )           | 1.13 $\pm$ 0.05 | 1.23 $\pm$ 0.08 |
| Flow cytometric analysis                     |                 |                 |
| T cell (%)                                   | 38.2 $\pm$ 2.1  | 35.1 $\pm$ 2.6  |
| CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>           | 1.67 $\pm$ 0.08 | 1.75 $\pm$ 0.08 |
| Naive (% CD4 <sup>+</sup> T cells)           | 78.4 $\pm$ 2.0  | 76.2 $\pm$ 2.3  |
| Memory/effector (% CD4 <sup>+</sup> T cells) | 20.7 $\pm$ 1.7  | 23.2 $\pm$ 2.2  |
| Proliferative response (SI) <sup>a</sup>     | 4.47 $\pm$ 0.14 | 4.64 $\pm$ 0.28 |

Values for non-obese mice ( $n = 5$ ) and obese mice ( $n = 5$ ) are expressed as means  $\pm$  SE. <sup>a</sup> The stimulation index (SI) is expressed as fluorescence from ConA-stimulated wells / fluorescence from non-stimulated wells.

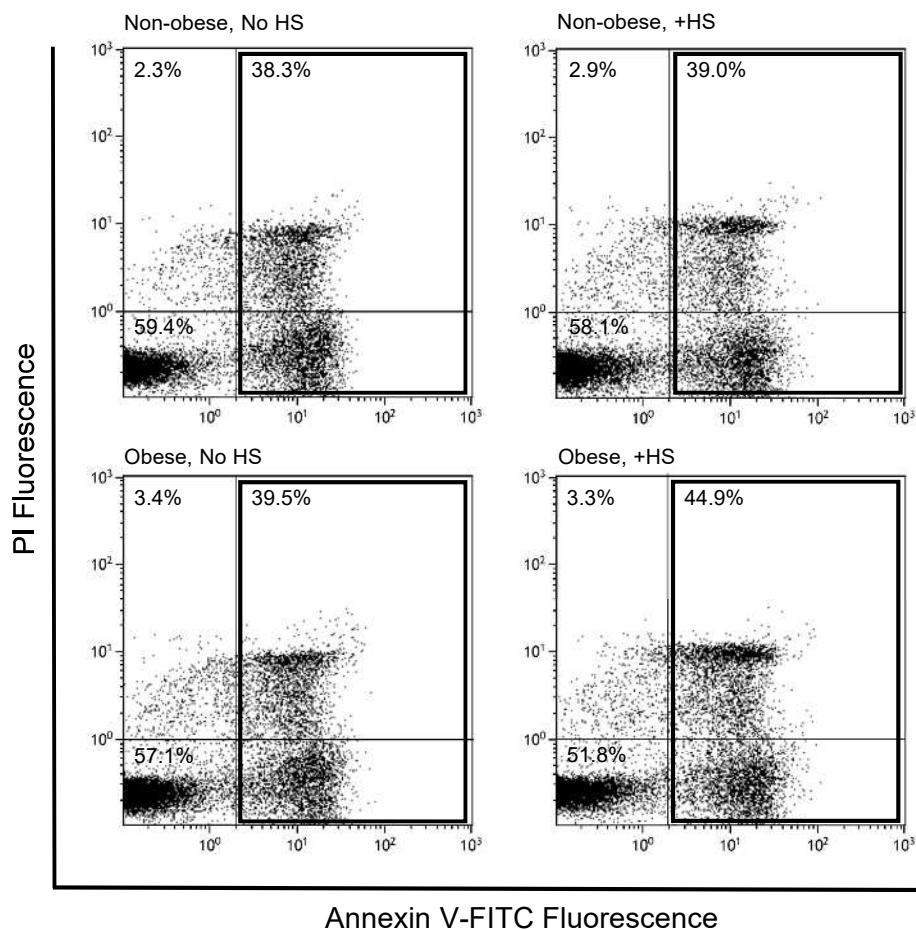


Figure 1-1A. Effects of obesity and heat shock on thymocyte apoptosis.

A, Representative flow cytometric analyses of heat-shocked thymocytes (right columns) and non-heat-shocked thymocytes (left columns) of non-obese mice (upper columns) and obese mice (lower columns).

Thymocytes from non-obese mice ( $n = 5$ ) and obese mice ( $n = 5$ ) were maintained at 37°C (No HS) or were exposed to heat shock at 42°C (+HS) for half an hour. After an overnight culture at 37°C, thymocytes were subjected to apoptosis analysis by staining cells with Annexin V-FITC and PI. Live cells (lower-left quadrant), apoptotic cells (upper-right and lower-right quadrants), and necrotic cells (upper-left quadrant).

HS, heat shock; PI, propidium iodide.

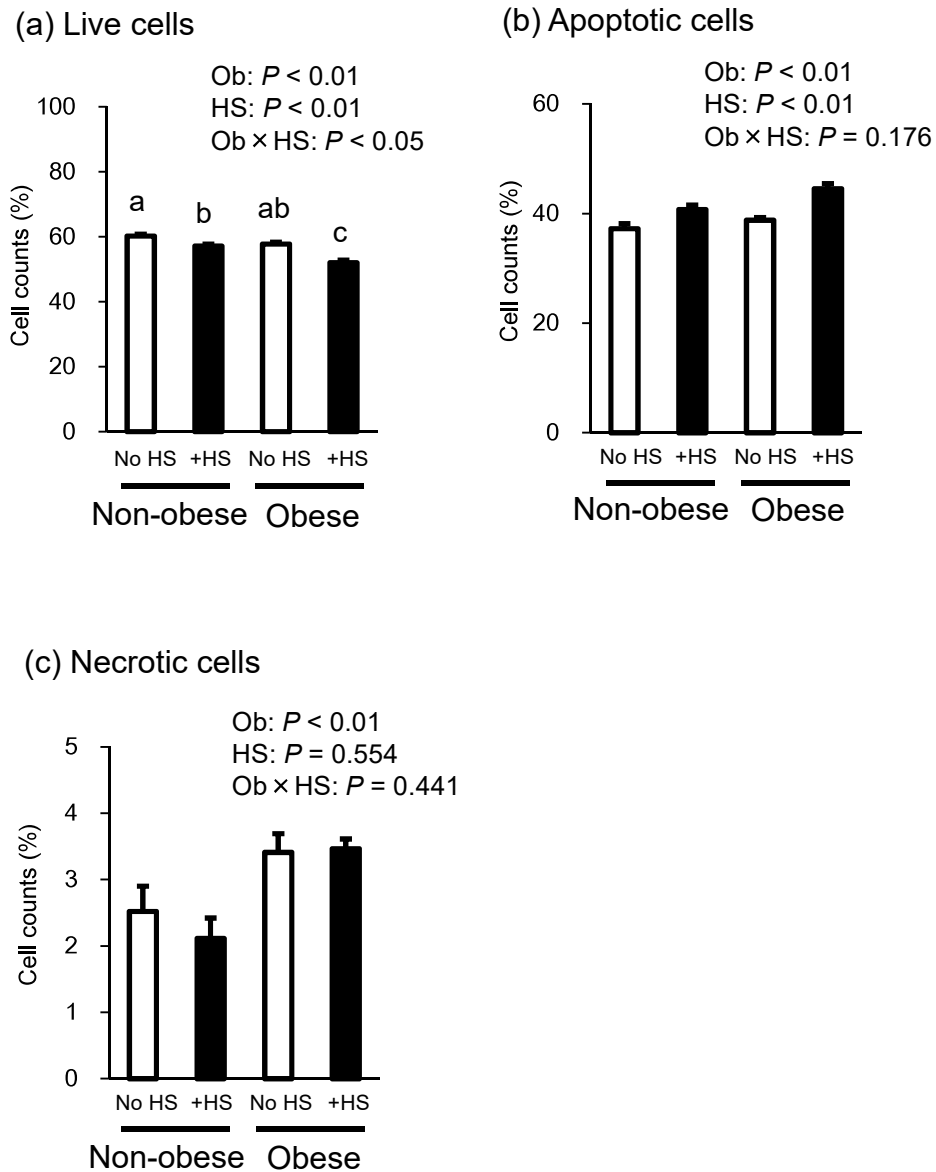
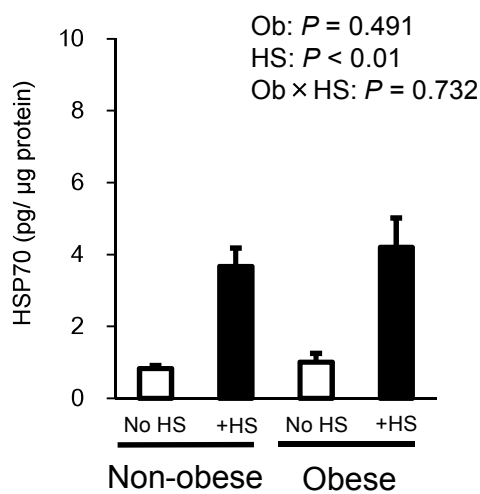


Figure 1-1B. Effects of obesity and heat shock on thymocyte apoptosis.

B, Quantitative analyses of (a) live cells, (b) apoptotic cells, and (c) necrotic cells for flow cytometric analyses.

Thymocytes from non-obese mice ( $n = 5$ ) and obese mice ( $n = 5$ ) were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  (No HS) or were exposed to heat shock at  $42^{\circ}\text{C}$  (+HS) for half an hour. After an overnight culture at  $37^{\circ}\text{C}$ , thymocytes were subjected to apoptosis analysis by staining cells with Annexin V-FITC and PI. Values are expressed as means  $\pm$  SE. Two-way ANOVA results of the effects of obesity (Ob), effect of heat shock (HS), and their interaction effect (Ob  $\times$  HS) are shown in the upper right. Data not sharing a common letter are significantly different by the Tukey post hoc test ( $P < 0.05$ ).

(a) Intracellular HSP70



(b) Extracellular HSP70

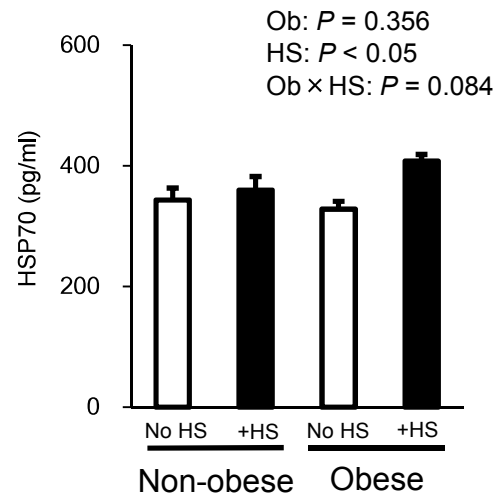
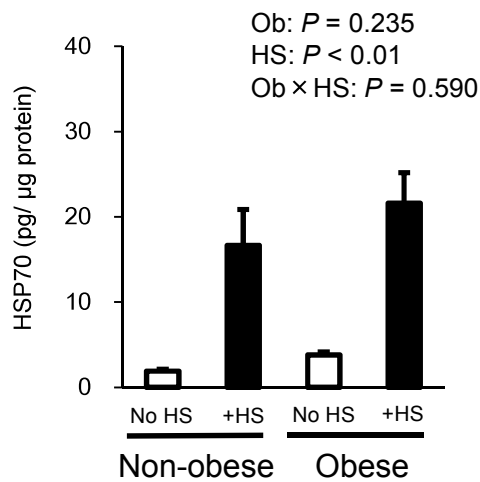


Figure 1-2. HSP70 protein levels of heat-shocked thymocytes of obese mice. Thymocytes from non-obese mice ( $n = 5$ ) and obese mice ( $n = 5$ ) were maintained at 37°C (No HS, white bars) or were exposed to heat shock at 42°C (+HS, black bars) for half an hour. After overnight culture at 37°C the HSP70 concentrations in the homogenized supernatant of each cell ((a) intracellular HSP70 protein level) and HSP70 concentrations in the culture supernatant ((b) extracellular HSP70 protein level) were measured. The intracellular HSP70 protein levels are expressed as the HSP70 concentration (pg/ml) / total protein concentration ( $\mu$ g/ml) in the homogenized supernatant of each cell. Values are expressed as means  $\pm$  SE. Two-way ANOVA results of the effects of obesity (Ob), effect of heat shock (HS), and their interaction effect (Ob  $\times$  HS) are shown in the upper right.

(a) Intracellular HSP70



(b) Extracellular HSP70

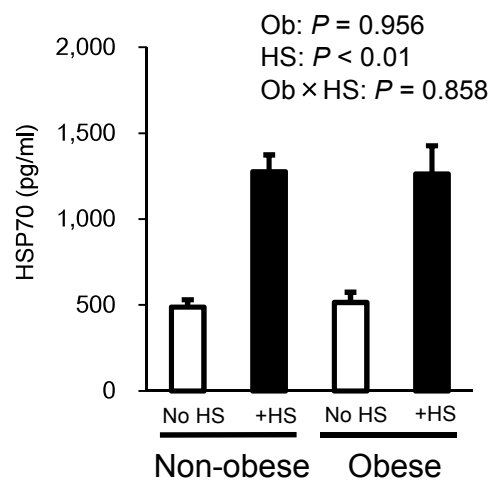


Figure 1-3. HSP70 protein levels of heat-shocked splenocytes of obese mice. Splenocytes from non-obese mice ( $n = 5$ ) and obese mice ( $n = 5$ ) were maintained at 37°C (No HS, white bars) or were exposed to heat shock at 42°C (+HS, black bars) for 1 hour. After culture at 37°C for 25 hours, the HSP70 concentrations in the homogenized supernatant of each cell ((a) intracellular HSP70 protein level) and HSP70 concentrations in the culture supernatant ((b) extracellular HSP70 protein level) were measured. The intracellular HSP70 protein levels are expressed as the HSP70 concentration (pg/ml) / total protein concentration (μg/ml) in the homogenized supernatant of each cell. Values are expressed as means  $\pm$  SE. Two-way ANOVA results of the effects of obesity (Ob), effect of heat shock (HS), and their interaction effect (Ob  $\times$  HS) are shown in the upper right.

**Table 1-5**

**Effects of obesity and heat shock on cytokine production of the splenocytes**

| Cytokine              | Non-obese  |             | Obese      |            | <i>P</i> value* |                 |         |
|-----------------------|------------|-------------|------------|------------|-----------------|-----------------|---------|
|                       | No HS      | + HS        | No HS      | + HS       | Ob              | HS              | Ob × HS |
| IFN- $\gamma$ (ng/ml) | 27.8 ± 1.0 | 19.5 ± 1.5  | 24.2 ± 1.0 | 19.0 ± 2.3 | 0.203           | <i>P</i> < 0.01 | 0.320   |
| IL-4 (pg/ml)          | 30.8 ± 1.9 | 27.0 ± 1.8  | 31.6 ± 4.9 | 28.0 ± 3.1 | 0.779           | 0.257           | 0.975   |
| IL-17 (pg/ml)         | 84.8 ± 8.5 | 92.8 ± 11.0 | 107 ± 6    | 114 ± 11   | <i>P</i> < 0.05 | 0.427           | 0.957   |
| IL-10 (pg/ml)         | 292 ± 21   | 199 ± 15    | 366 ± 47   | 271 ± 25   | <i>P</i> < 0.05 | <i>P</i> < 0.01 | 0.979   |

Values are expressed as means ± SE. The splenocytes from non-obese mice (*n* = 5) and obese mice (*n* = 5) were maintained at 37°C (No HS) or were exposed to heat shock at 42°C (+ HS) for 1 hour. After recovery at 37°C for 1 hour, the cells were stimulated with ConA at 37°C for 24 hours. The concentrations of cytokines in the collected culture supernatants were measured by ELISA.

\* *P* values of two-way ANOVA about the effect of obesity (Ob), the effect of heat shock (HS), and their interaction effect (Ob × HS).

## 第2章 肥満の脂肪組織および免疫細胞における解析：サイトカイン、熱ショックタンパク質ならびに免疫栄養素についての検討【研究2および3】

肥満において、全身の免疫系が変化することに加え、脂肪組織における慢性炎症の病態への関与が示されてきている。脂肪組織は、実質細胞である脂肪細胞ならびに免疫細胞を含む間質細胞から構成される。肥満においては、脂肪細胞から分泌される生理活性物質の分泌異常が生じることに加え、脂肪組織に存在する免疫細胞の組成および機能が変化し、脂肪組織における炎症性サイトカインの産生増加および抗炎症性サイトカインの産生低下に関与する<sup>49)</sup>。肥満の脂肪組織から分泌される炎症性サイトカインは、肝臓や筋肉などに作用してインスリン抵抗性を惹起させるなど、肥満に関連した病態の形成に関与する<sup>50)</sup>。

研究1より、免疫細胞における熱ショックタンパク質（Heat shock protein ; HSP）の発現が肥満によって変化する可能性、また HSP 発現の変化がサイトカイン産生の変化につながることで病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。脂肪組織における HSP70 発現に関して、肥満者において内臓脂肪組織および脂肪細胞の HSP70 レベルの低下とインスリン抵抗性との関連を示唆する報告や<sup>51,52)</sup>、肥満者と非肥満者の比較において皮下脂肪組織 HSP70 発現が肥満者で高いとの報告もあり<sup>40)</sup>、肥満において、脂肪組織におけるサイトカインの変化に加えて HSP70 発現の変化が病態に関与する可能性がある。

免疫系に影響を及ぼし得る栄養素の1つとして L-glutamine（以下、グルタミン）が挙げられる。グルタミンは、体内の遊離アミノ酸の中で最も多く存在するアミノ酸であり、免疫細胞や腸管の粘膜細胞のエネルギー基質となること、抗酸化物質であるグルタチオン合成に関与すること、サイトカイン産生への影響等、生体内において免疫系を含む種々の機能において重要な役割を果たす<sup>18,53,54)</sup>。さらに、グルタミンは、熱ショック転写因子1（Heat shock transcription factor 1 ; HSF1）のトランスアクチベーション活性および発現を上昇させることにより HSP 発現を高めることが示されている<sup>55-57)</sup>。グルタミンは生体内で合成され得ることから可欠アミノ酸に分類されているが、一方で感染、敗血症、重度熱傷等の疾患状態や授乳中等の生理学的状態において必要量が高まり、体内のグルタミン濃度の低下につながる<sup>58,59)</sup>。肥満者および2型糖尿病罹患患者において、血中アミノ酸濃度の解析によりグルタミン濃度が低下しているとの報告もある<sup>60,61)</sup>。

本章では、肥満の免疫機能および熱ショックタンパク質について脂肪組織にも注目し解析を行った。さらに、免疫機能および HSP70 発現との関連が示されているグルタミンが肥満に及ぼす影響についても検討を行った。本章は、研究2および3の以下の2つの研究



で構成されている。

#### 研究 2：肥満モデルマウスにおける脂肪組織および免疫細胞の検討

肥満モデルマウスの脂肪組織および免疫細胞におけるサイトカインおよび **HSP70** レベル、ならびにグルタミン摂取がそれら因子に及ぼす影響を中心に解析を行った。

#### 研究 3：肥満モデルマウスの脂肪組織培養における検討

肥満モデルマウスの脂肪組織培養において、グルタミン濃度の違いがサイトカインおよび **HSP70** レベルに及ぼす影響を検討した。

## 肥満モデルマウスにおける脂肪組織および免疫細胞の検討 [研究 2]

### 1. 緒言

肥満における免疫細胞および脂肪組織のサイトカインの変化は、肥満の病態に影響を及ぼす。一方、肥満および糖尿病において HSP70 の発現が種々の臓器において変化していること<sup>10-12)</sup>、HSP70 発現を上昇させることによりインスリン抵抗性が改善されること<sup>62)</sup>など HSP70 発現と肥満との関連について報告されており、免疫細胞および脂肪組織においても肥満による HSP70 の変化が病態と関連する可能性がある。

グルタミンは、サイトカイン産生を含む免疫機能や HSP70 発現に作用し得るアミノ酸である。先行研究において、グルタミンの摂取が T 細胞やマクロファージによるサイトカイン産生を変化させたとの報告や<sup>63,64)</sup>、末梢血単核細胞の HSP70 レベルを高めたとの報告<sup>65)</sup>がある。また、肥満への影響に関して、マウスにおいて高脂肪食摂取下でのグルタミン摂取が体重や血糖値の上昇を抑制したとの報告がある<sup>66)</sup>。

研究 2 では、肥満における脂肪組織および免疫細胞のサイトカインおよび HSP70 レベルについて検討すること、ならびにグルタミン摂取がそれら因子に及ぼす影響を検討するため、高脂肪食により誘導した肥満モデルマウスの脂肪組織および脾細胞のサイトカインおよび HSP70 レベルを解析し、さらに高脂肪食へのグルタミン添加による影響を解析した。

### 2. 実験方法

#### 2-1. 実験動物

実験には 5 週齢の C57BL/6J 雄マウス（三協ラボサービス）を用いた。マウスは 12 時間毎の明暗サイクル（消灯時間：午後 7 時～午前 7 時）において温度 20～26℃、湿度 30～70% に管理した環境下で飼育した。飼料および蒸留水は自由摂取とした。体重および飼料摂取量を週 1 回測定した。なお、本研究は日本女子大学動物実験委員会の承認のもと、日本女子大学動物実験規程に従った。

#### 2-2. 実験プロトコール

普通食（AIN-93M 標準飼料、Standard diet ; SD）で 1 週間馴化飼育を行った後に 3 群に分け、普通食、高脂肪食（High fat diet ; HFD）、またはグルタミンを添加した高脂肪食（High-fat diet supplemented with glutamine ; HFD-Gln）のいずれかを摂取させ

た（各群  $n = 5$ ）。HFD 食は、普通食においてコーンスターチの一部をラードに置き換えることにより脂肪エネルギー比率を 60%とした。HFD-Gln 食は、HFD 食のコーンスターチの一部をグルタミンに置き換えたものとした。実験飼料の組成を Table 2-1 に示す。12 週間の実験食の後に解剖を行った。下記の方法によって各解析を行った。

### 2-3. 臓器重量

内臓脂肪（精巣上体脂肪、腎周囲脂肪および腸間膜脂肪）、皮下脂肪（鼠径部脂肪）、脾臓、肝臓および腎臓の重量を測定した。肝臓および脂肪組織の一部を解析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 2-4. 血液生化学検査

解剖時の随時採血において、血糖値を小型血糖測定器グルコカードダイアメーター  $\alpha$ （アークレイファクトリー）で測定した。遠心分離により血清を採取し、解析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。血清インスリン濃度をレビスインスリン測定用 ELISA キット（シバヤギ）を用いて測定した。血清レプチン濃度およびアディポネクチン濃度の測定を DuoSet kit（R&D Systems）を用いて ELISA 法により行った。

### 2-5. フローサイトメトリー解析

脾臓より研究 1 と同様に 5 %FBS 含有 RPMI1640 培地に細胞浮遊液を調製し、脾細胞を蛍光標識抗体と反応させた。FACScan フローサイトメーター（BD Biosciences）により測定し、CellQuest ソフトウェア（BD Biosciences）を用いてリンパ球集団における細胞比率を解析した。脾細胞を FITC 標識抗 CD3 抗体（T 細胞マーカー）ならびに Phycoerythrin（PE）標識抗 CD4 抗体および Fluorescein isothiocyanate（FITC）標識抗 CD8 抗体で染色した（BD Biosciences）。

### 2-6. 脾細胞培養実験

脾細胞をマイトジェンである  $5 \mu\text{g/ml}$  Concanavalin A（ConA、Sigma）の存在下で  $37^{\circ}\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて培養した。

脾臓リンパ球幼若化反応の測定は、96 穴平底プレート中  $5 \times 10^4$  cells/well での 72 時間の培養後、Alamar Blue 法によって測定した<sup>34)</sup>。Alamar Blue（Bio-Rad）を  $10 \mu\text{l/well}$  添加し、さらに 4 時間培養した後に 544/590nm で蛍光強度を測定し、Stimulation Index

(SI ; 下式) として評価した :

$$SI = \text{ConA 刺激下での蛍光強度} / \text{無刺激下での蛍光強度}$$

脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度の測定のため、24 穴平底プレート中  $5 \times 10^6$  cells/well で 48 時間培養し、遠心分離 (4 °C、3,000rpm、10 分間) により上清を得た。回収した上清は解析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。サイトカイン濃度の測定は DuoSet kit (R&D Systems) を用いて ELISA 法にて Interferon (IFN)  $-\gamma$ 、Interleukin (IL)  $-2$ 、IL-4、IL-10 および IL-17 を測定した。

## 2-7. 脂肪組織の培養実験

精巢上体脂肪組織を 24 穴平底プレートに 3 %FBS 含有 DMEM 培地中、約 10mg/well で播種し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。回収した上清は解析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。サイトカイン濃度の測定は DuoSet kit (R&D Systems) を用い、レプチン、アディポネクチン、IL-6 および IL-10 を ELISA 法にて測定した。培養上清中サイトカイン濃度を播種時に測定した脂肪組織の重量で補正した。

## 2-8. HSP70 タンパク質レベル

精巢上体脂肪組織、脾細胞および肝臓の HSP70 タンパク質レベルを解析した。脂肪組織および肝臓は解剖時に摘出した臓器において、脾細胞は HSP70 誘導についても検討を行うため熱ショック刺激ありまたはなしの条件下で培養した後の脾細胞において解析した。

脾細胞を 24 穴平底プレート中  $5 \times 10^6$  cells/well で播種し、42°Cに設定した 5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中に 1 時間置くことにより熱ショックを加えた。一方で、対照群としての熱ショックを加えない群は 37°Cに置いた。その後、両群のプレートを 37°C、5 %CO<sub>2</sub> インキュベーターに 4 時間置いた後、遠心分離 (4 °C、3,000rpm、10 分間) によって脾細胞を回収した。回収した細胞は解析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

組織または細胞をプロテアーゼ阻害剤 (complete ; Roche) を添加した T-PER buffer (Thermo Fisher Scientific) 中でホモジナイズし、遠心分離によりホモジナイズ上清を得た。脂肪組織および肝臓ではホモジナイザー (Polytron PT1300D、Kinematica) を用い、4 °C、3,500rpm、10 分間および 15,000rpm、5 分間の計 2 回遠心分離した。脾細胞ではペレットペッスル (Kontes) を用いてホモジナイズし、4 °C、15,000rpm、5 分間

で遠心分離した。

ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を ELISA 法による Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC kit (R&D Systems)、総タンパク質濃度を BCA (Bicinchoninic Acid) 法による BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を総タンパク質濃度で除した値を HSP70 タンパク質レベルとした。

## 2-9. 肝臓中トリグリセリドレベル

肝臓組織約 30mg を 300  $\mu$ l イソプロパノール中でホモジナイズし、遠心分離 (25°C、5,100rpm、10 分間) により上清を回収した。ホモジナイズ上清中のトリグリセリド濃度を TG E-test Wako キット (Wako) を用いて測定した。ホモジナイズ上清中のトリグリセリド濃度をホモジナイズ前に測定した肝臓組織の重量で補正した値を肝臓中トリグリセリドレベルとした。

## 2-10. 統計解析

結果を平均値 $\pm$ 標準誤差として示す。対応のない t 検定により 2 群間比較を行った。統計学的処理に SPSS Statistics version 25 (IBM) を使用し、有意水準を 5%とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 高脂肪食摂取マウスの特徴

HFD 群および SD 群の特徴を Table 2-2 に示す。HFD 群は SD 群と比較して体重および脂肪重量が高値であり、肥満の誘導が確認された。また、HFD 群は SD 群と比較して血清インスリン濃度およびレプチン濃度が高値であった。血糖値および血清アディポネクチン濃度においては2群間に有意差はなかった。臓器重量において、HFD 群は SD 群に比して腎臓重量が有意に高値であり、肝臓重量では高値傾向を示した ( $P = 0.066$ )。脾臓重量、脾細胞の総数、フローサイトメトリー解析、リンパ球幼若化反応は2群間に有意差はなかった。

#### 3-2. 高脂肪食摂取マウスのサイトカインレベル

HFD 群および SD 群由来の脂肪組織およびT細胞マイトジェン刺激脾細胞の培養上清中サイトカイン濃度を Table 2-3 に示す。脂肪組織の結果において、HFD 群は SD 群と比較してレプチン濃度が高値であり、アディポネクチン濃度は低値であった。IL-10 濃度は脂肪組織においても脾細胞においても HFD 群で低値傾向であった（それぞれ、 $P = 0.096$ 、 $P = 0.099$ ）。その他のサイトカインにおいては有意差を認めなかった。

#### 3-3. 高脂肪食摂取マウスの HSP70 タンパク質レベル

HFD 群の脂肪組織 HSP70 タンパク質レベルは SD 群と比較して低値傾向であった ( $P = 0.125$ ) (Fig. 2-1(a))。脾細胞 HSP70 タンパク質レベルは、熱ショックを加えた場合も加えない場合も HFD 群で有意に低値であった (Fig. 2-1(b)および(c))。

#### 3-4. グルタミン摂取が高脂肪食摂取マウスに及ぼす影響

グルタミン摂取が高脂肪食摂取マウスに及ぼす影響を検討するため、HFD 群および HFD-Gln 群の特徴を比較した結果を Table 2-4 に示す。実験食期間中の食餌摂取量およびエネルギー摂取量は群間に有意差はなかった。脂肪重量測定において、HFD-Gln 群は HFD 群に比して腸間膜脂肪重量が低値傾向であった ( $P = 0.079$ )。その他の脂肪重量および体重は、HFD-Gln 群において低値であったが統計学的有意差は認めなかった。臓器重量測定では、HFD-Gln 群において肝臓重量が有意に低値であった。脾臓重量および腎臓重量においては群間に有意差はなかった。血液生化学検査および脾細胞の総数、フローサイトメトリー解析、リンパ球幼若化反応においても群間に有意差は認めなかった。

### 3-5. グルタミン摂取が高脂肪食摂取マウスのサイトカインレベルに及ぼす影響

HFD 群および HFD-Gln 群由来の脂肪組織およびT細胞マイトジェン刺激脾細胞の培養上清中サイトカイン濃度を Table 2-5 に示す。高脂肪食摂取マウスのサイトカインレベルに対するグルタミン摂取の統計学的に有意な影響は認めなかった。

### 3-6. グルタミン摂取が高脂肪食摂取マウスの HSP70 タンパク質レベルに及ぼす影響

HFD-Gln 群は、HFD 群と比較して脂肪組織 HSP70 タンパク質レベルが有意に高値であり、グルタミン摂取による脂肪組織 HSP70 の増加が認められた (Fig. 2-2(a))。脾細胞 HSP70 タンパク質レベルにおいては、熱ショックを加えた場合も加えない場合も群間に有意差を認めなかった。

### 3-7. 肝臓中トリグリセリドおよび HSP70 タンパク質レベル

肝臓中トリグリセリドレベルは、HFD 群が SD 群と比較して有意に高値であり、HFD-Gln 群は HFD 群に比して低値傾向であった ( $P=0.056$ ) (Fig. 2-3(a))。肝臓 HSP70 タンパク質レベルは SD 群と比較して HFD 群において低値傾向であり ( $P=0.110$ ) (Fig. 2-3(b))、HFD 群と HFD-Gln 群においては有意差はなかった。

#### 4. 考察

本研究では、高脂肪食摂取により誘導した肥満モデルマウスの脂肪組織および脾細胞におけるサイトカインおよび HSP70 レベルを検討した。

肥満において T 細胞は数、サブセット分布、機能が炎症性に变化し、全身性炎症や脂肪組織炎症に関与することが示されてきている<sup>26,67)</sup>。肥満の脂肪組織においては炎症性のヘルパー T1 (T helper 1 ; Th1) 細胞や M1 マクロファージ等が増加するのに対し、非肥満の脂肪組織においては抗炎症性サイトカインである IL-10 等を産生する制御性 T (Regulatory T ; Treg) 細胞、Th2 細胞、M2 マクロファージ等が優勢であり、脂肪組織における炎症および機能不全を抑制する<sup>50,68)</sup>。本研究において高脂肪食を摂取した HFD 群と標準飼料を摂取した SD 群の比較の結果、脂肪組織および T 細胞マイトジェン刺激脾細胞によるサイトカイン産生において HFD 群で IL-10 産生の低下傾向が認められた。

近年、肥満やインスリン抵抗性が HSP70 発現の変化と関連することが示されてきている<sup>10-12)</sup>。本研究における精巣上体脂肪組織の HSP70 タンパク質レベルの解析では、HFD 群が SD 群に比して低値傾向であった。この結果は、肥満者の内臓脂肪組織 HSP70 レベルの低下とインスリン抵抗性との関連を示唆する先行研究<sup>51,52)</sup>と同様の結果であった。本研究における脾細胞 HSP70 タンパク質レベルの解析においても、熱ショックの有無にかかわらず HFD 群が SD 群と比較して低値であり、肥満において免疫細胞においても HSP70 レベルが低下することが示された。この結果は、肥満者と正常体重者の末梢血単核細胞のマイクロアレイ解析において、肥満者において発現が低下している遺伝子として HSP70 遺伝子である HSPA1A が同定された結果と同様の結果であった<sup>69)</sup>。一方で、他の先行研究においては肥満者の末梢血単核細胞において HSP70 レベルが高値であったことが報告されている<sup>40)</sup>。同報告はまた、皮下脂肪組織における検討において、糖尿病を伴う肥満者は、糖尿病ではない肥満者と比較して HSP70 タンパク質レベルが低値であることを示している<sup>40)</sup>。HSF/HSP 経路は酸化ストレス、炎症性メディエーター産生の増加など肥満に関連した状態により活性化されることから<sup>39)</sup>、糖尿病ではない肥満者においては HSP70 誘導がいまだ維持されており、肥満関連細胞ストレスに抗し得る状態であったことが示唆される。本論文の研究 1 においては、脾細胞 HSP70 タンパク質レベルは肥満群と非肥満群とで有意差を認めなかった。本研究 2 では、研究 1 と比較して高脂肪食による肥満の期間がより長期であり、抗炎症性サイトカインである IL-10 産生において、研究 1 では肥満群で高値であったが、本研究 2 では HFD 群でむしろ低値傾向であった。したがって、肥満が長期に及ぶ場合、HSP70 発現がより低下し、肥満の病態に影響を及ぼす可



能性が示唆された。

さらに、本研究ではグルタミン摂取がサイトカインおよび HSP70 レベルを含む肥満病態に及ぼす影響について解析した。高脂肪食を摂取する HFD 群およびグルタミンを添加した高脂肪食を摂取する HFD-Gln 群の 2 群間比較を行った結果、HFD-Gln 群が HFD 群に比して脂肪組織 HSP70 タンパク質レベルが高値であった。肥満における脂肪組織の炎症はインスリン抵抗性等の病態に関与することが明らかになってきている<sup>70)</sup>。また、脂肪細胞におけるタンパク質のミスフォールディング等から生じるタンパク質恒常性の低下はインスリン抵抗性と関連することが示唆されている<sup>51)</sup>。一方で、HSP70 は NF- $\kappa$ B 活性化の阻害等による抗炎症作用を有する<sup>15)</sup>。また、HSP70 はミスフォールディングを起こしたタンパク質を修復するなど、タンパク質恒常性の維持に寄与する<sup>15,71)</sup>。よって、本研究から、グルタミン摂取により脂肪組織 HSP70 レベルが増加し、肥満における脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性を低減し得る可能性が示唆された。しかしながら、脂肪組織培養上清中サイトカイン濃度の解析ではグルタミン摂取によるサイトカインの有意な変化は認められなかった。グルタミンが敗血症を誘導したマウスのサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した先行研究において、脾細胞の培養上清中サイトカイン濃度で解析した場合には有意な影響が認められず<sup>72)</sup>、一方で脾臓の mRNA 解析によってグルタミン摂取によるサイトカインの変化を認めたとの報告がある<sup>73)</sup>。本研究においては、脂肪組織のサイトカインレベルを同一培養条件下で評価したが、HFD 群と HFD-Gln 群とで体内での脂肪組織におけるグルタミン濃度を含めた状態が異なる可能性があり、グルタミン摂取が脂肪組織 HSP70 レベルを高めたことによるサイトカインへの影響について、より生体内での状態を反映したさらなる検討が求められる。

グルタミンにより HSP70 レベルが上昇したメカニズムとして、グルタミンによる HSF1 のトランスアクチベーション活性および遺伝子発現の上昇が挙げられる<sup>56,57)</sup>。また、グルタミンが脂肪組織の HSF1 に直接に作用した可能性に加えて、グルタミンの代謝への影響によって肥満およびインスリン抵抗性の進行が抑制されたことにより脂肪組織の HSP70 レベルが維持された可能性がある。本研究において、HFD-Gln 群は HFD 群と比較して体重および脂肪重量が統計学的に有意ではないものの低値であり、肥満または 2 型糖尿病の症例および動物モデルにおいてグルタミン補給が肥満を抑制したことを示す先行研究と同様の結果を示した<sup>66,74,75)</sup>。グルタミンが肥満における代謝に及ぼす影響のメカニズムとしては、グルタミンがグルカゴン様ペプチド 1 (Glucagon-like peptide 1; GLP-1) の放出を刺激することによる可能性等が示唆されている<sup>74,75)</sup>。

脾細胞における HSP70 レベルおよびT細胞マイトジェン刺激下でのサイトカインレベルはHFD-Gln群とHFD群との間で有意差を認めなかった。グルタミンは脾臓を含む種々の組織により利用される一方で、筋肉組織および脂肪組織を含む筋肉組織以外の組織により血液循環に放出され、安定した血中グルタミン濃度が維持される<sup>76)</sup>。本研究においてグルタミンが HSP70 レベルに及ぼす影響が脂肪組織と脾細胞とで異なっていたことは、組織間でのグルタミン濃度や代謝の違いによる可能性がある。また、グルタミンは免疫細胞により多く消費されるため、炎症部位でのグルタミン消費の増加はグルタミン濃度の低下につながることから<sup>77)</sup>、肥満では脂肪組織の慢性炎症によりグルタミン濃度が変化し、グルタミン摂取の影響を受けやすい可能性がある。

肥満における脂肪組織炎症および脂肪組織の機能不全は、炎症性サイトカインの増加、抗炎症作用を有するアディポネクチンの低下、肝臓への遊離脂肪酸の流入を生じ、肝臓でのインスリン抵抗性および非アルコール性脂肪性肝疾患（Nonalcoholic fatty liver disease ; NAFLD）につながる<sup>78)</sup>。近年の先行研究により、肥満者において脂肪組織 HSP70 レベルの低下と NAFLD の進行度とに相関があることが示された<sup>52)</sup>。本研究において肝臓についても解析を行った結果、HFD-Gln 群は HFD 群と比較して肝臓中トリグリセリドレベルが低値傾向を示し、グルタミンが NAFLD に対して保護的に作用する可能性が示唆された。本研究と同様にグルタミンによる NAFLD に対する保護効果を示す報告<sup>79,80)</sup>もなされてきており、グルタミン摂取量と NAFLD との関連およびグルタミンによる病態の改善法等についてさらなる検討が望まれる。本研究においてはグルタミン摂取による肝臓 HSP70 タンパク質レベルへの影響は認められなかったが、これらのグルタミンの保護効果がグルタミンによる脂肪組織 HSP70 レベルの増加と関連する可能性もあり、脂肪組織 HSP70 レベルと NAFLD との関連についてさらなる検討が求められる。

## 5. 要旨

本研究では、高脂肪食摂取により誘導した肥満モデルマウスの脂肪組織および脾細胞におけるサイトカインおよび **HSP70** レベル、ならびにグルタミン摂取がそれら因子に及ぼす影響を中心に検討した。**C57BL/6J** 雄マウスを普通食 (**SD**)、高脂肪食 (**HFD**)、またはグルタミンを添加した高脂肪食 (**HFD-Gln**) を与える群に分け、12 週間の実験食の後に解析した。**HFD** 群は **SD** 群と比較して脾細胞の **HSP70** タンパク質レベルが有意に低く、脂肪組織 **HSP70** タンパク質レベルにおいて低値傾向であった。また、脂肪組織および脾細胞の **IL-10** レベルが **HFD** 群において低値傾向であった。グルタミンの影響を検討した結果、**HFD-Gln** 群は **HFD** 群に比して脂肪組織 **HSP70** レベルが高値であり、肝臓中トリグリセリドレベルが低値傾向であった。以上の結果から、肥満において脂肪組織および免疫細胞における **HSP70** レベルが低下することが肥満病態と関連する可能性が示唆された。また、グルタミンにより脂肪組織 **HSP70** レベルが変化し、肥満に関連する病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

**Table 2-1****Diet compositions.**

| Ingredient (g/kg diet)          | SD       | HFD      | HFD-Gln  |
|---------------------------------|----------|----------|----------|
| Casein                          | 140      | 140      | 140      |
| Cystine                         | 1.8      | 1.8      | 1.8      |
| Glutamine                       | 0        | 0        | 40       |
| Soybean oil                     | 40       | 40       | 40       |
| Lard                            | 0        | 290      | 290      |
| Cornstarch                      | 465.7    | 175.7    | 135.7    |
| $\alpha$ -Cornstarch            | 155      | 155      | 155      |
| Sucrose                         | 100      | 100      | 100      |
| Cellulose                       | 50       | 50       | 50       |
| AIN-93M mineral mix             | 35       | 35       | 35       |
| AIN-93 vitamin mix              | 10       | 10       | 10       |
| Choline bitartrate              | 2.5      | 2.5      | 2.5      |
| <i>tert</i> -Butyl hydroquinone | 0.008    | 0.008    | 0.008    |
| Energy (kcal/100g diet)         | 349      | 519      | 520      |
| P:F:C (% of energy)             | 15:11:74 | 10:60:30 | 13:60:27 |

SD, standard diet; HFD, high-fat diet; HFD-Gln, high-fat diet supplemented with glutamine; AIN-93, American Institute of Nutrition-93; P:F:C, protein, fat, and carbohydrate.

**Table 2-2****Characteristics of the HFD-fed mice.**

|  | SD            | HFD             |
|--|---------------|-----------------|
| Body weight (g)                          | 30.3 ± 0.7    | 38.2 ± 1.6**    |
| Fat pad weight (g)                       |               |                 |
| Epididymal fat                           | 0.557 ± 0.103 | 1.874 ± 0.247** |
| Perirenal fat                            | 0.223 ± 0.051 | 0.822 ± 0.121** |
| Mesenteric fat                           | 0.338 ± 0.038 | 0.757 ± 0.091** |
| Subcutaneous fat                         | 0.131 ± 0.020 | 0.441 ± 0.078** |
| Organ weight (g)                         |               |                 |
| Spleen                                   | 0.118 ± 0.018 | 0.081 ± 0.007   |
| Liver                                    | 1.254 ± 0.040 | 1.374 ± 0.040   |
| Kidney                                   | 0.308 ± 0.007 | 0.334 ± 0.007*  |
| Blood biomarker <sup>a</sup>             |               |                 |
| Blood glucose (mg/dl)                    | 268 ± 30      | 299 ± 35        |
| Serum insulin (ng/ml)                    | 0.88 ± 0.15   | 3.17 ± 0.95*    |
| Serum leptin (ng/ml)                     | 2.45 ± 1.21   | 15.0 ± 3.9*     |
| Serum adiponectin (µg/ml)                | 6.23 ± 0.61   | 6.98 ± 0.43     |
| Splenocyte                               |               |                 |
| Total cell count (× 10 <sup>8</sup> )    | 1.41 ± 0.12   | 1.23 ± 0.07     |
| T cell (%)                               | 26.9 ± 3.7    | 32.7 ± 1.0      |
| CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>       | 2.09 ± 0.27   | 1.86 ± 0.12     |
| Proliferative response (SI) <sup>b</sup> | 7.23 ± 0.68   | 7.10 ± 1.21     |

Values are expressed as means ± SE. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ . Animals per group:  $n = 5$ . <sup>a</sup> Blood samples were obtained in the non-fasting state. <sup>b</sup> The stimulation index (SI) is expressed as fluorescence from concanavalin A-stimulated wells / fluorescence from non-stimulated wells. SD, standard diet; HFD, high-fat diet.

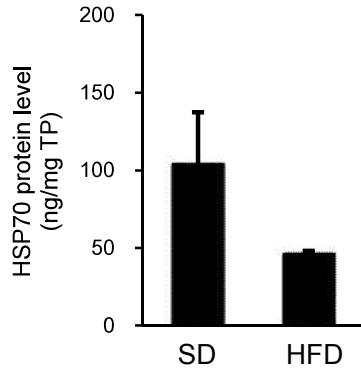
**Table 2-3****Cytokine levels of adipose tissues and splenocytes of the HFD-fed mice.**

|   | SD          | HFD           |
|---|-------------|---------------|
| Cytokine levels of adipose tissues <sup>a</sup>             |             |               |
| Leptin (pg/ml/mg AT)  | 28.7 ± 7.1  | 142 ± 22**    |
| Adiponectin (ng/ml/mg AT)                                   | 2.12 ± 0.16 | 1.33 ± 0.13** |
| IL-6 (pg/ml/mg AT)  | 20.6 ± 3.6  | 18.3 ± 2.2    |
| IL-10 (pg/ml/mg AT)   | 1.95 ± 0.72 | 0.55 ± 0.17   |
| Cytokine levels of ConA-stimulated splenocytes <sup>b</sup> |             |               |
| IFN-γ (ng/ml)   | 13.1 ± 1.4  | 17.3 ± 3.1    |
| IL-2 (ng/ml)  | 2.58 ± 0.64 | 3.32 ± 0.44   |
| IL-4 (pg/ml)  | 42.9 ± 2.6  | 42.4 ± 4.7    |
| IL-10 (pg/ml)   | 337 ± 17    | 280 ± 26      |
| IL-17 (pg/ml)   | 47.4 ± 14.9 | 81.6 ± 12.9   |

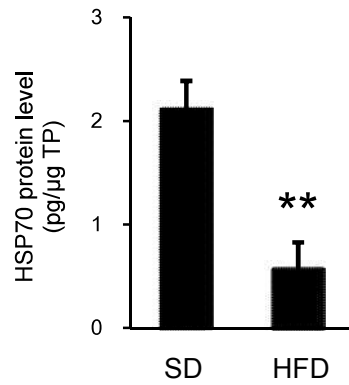
Values are expressed as means ± SE. \*\* $P < 0.01$ . Animals per group:  $n = 5$ .

<sup>a</sup> Cytokine concentrations in the culture supernatant of adipose tissue were measured with ELISA and normalized to accurate wet weight of cultured adipose tissue. <sup>b</sup> Cytokine concentrations in the culture supernatant of ConA-stimulated splenocytes were measured with ELISA. SD, standard diet; HFD, high-fat diet; AT, adipose tissue; ConA, concanavalin A.

(a)



(b)



(c)

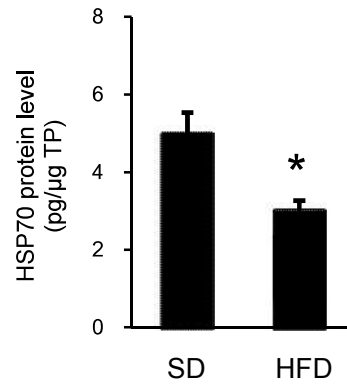


Figure 2-1. HSP70 levels in HFD-induced obese mice. HSP70 protein levels are expressed as HSP70 concentration (ng/ml) / total protein concentration (mg/ml) values in the homogenized supernatant of epididymal adipose tissues (a), splenocytes without heat shock (b), and splenocytes with heat shock at 42°C (c). Values are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Animals per group:  $n = 5$ . SD, standard diet; HFD, high-fat diet; TP, total protein.

**Table 2-4****Comparison of mouse characteristics of the HFD-fed mice and HFD-Gln-fed mice.**

|  | HFD           | HFD-Gln        |
|--|---------------|----------------|
| Food intake (g/day) <sup>a</sup>         | 2.8 ± 0.1     | 3.0 ± 0.2      |
| Energy intake (kcal/day) <sup>a</sup>    | 14.5 ± 0.8    | 15.7 ± 0.8     |
| Body weight (g)                          | 38.2 ± 1.6    | 34.9 ± 2.1     |
| Fat pad weight (g)                       |               |                |
| Epididymal fat                           | 1.874 ± 0.247 | 1.385 ± 0.321  |
| Perirenal fat                            | 0.822 ± 0.121 | 0.659 ± 0.133  |
| Mesenteric fat                           | 0.757 ± 0.091 | 0.514 ± 0.078  |
| Subcutaneous fat                         | 0.441 ± 0.078 | 0.333 ± 0.089  |
| Organ weight (g)                         |               |                |
| Spleen                                   | 0.081 ± 0.007 | 0.078 ± 0.006  |
| Liver                                    | 1.374 ± 0.040 | 1.227 ± 0.044* |
| Kidney                                   | 0.334 ± 0.007 | 0.336 ± 0.014  |
| Blood biomarker <sup>b</sup>             |               |                |
| Blood glucose (mg/dl)                    | 299 ± 35      | 291 ± 55       |
| Serum insulin (ng/ml)                    | 3.17 ± 0.95   | 1.81 ± 0.60    |
| Serum leptin (ng/ml)                     | 15.0 ± 3.9    | 7.73 ± 2.67    |
| Serum adiponectin (µg/ml)                | 6.98 ± 0.43   | 6.25 ± 0.12    |
| Splenocyte                               |               |                |
| Total cell count (× 10 <sup>8</sup> )    | 1.23 ± 0.07   | 1.27 ± 0.14    |
| T cell (%)                               | 32.7 ± 1.0    | 30.8 ± 0.8     |
| CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>       | 1.86 ± 0.12   | 2.02 ± 0.08    |
| Proliferative response (SI) <sup>c</sup> | 7.10 ± 1.21   | 6.15 ± 0.55    |

Values are expressed as means ± SE. \* $P < 0.05$ . Animals per group:  $n = 5$ . <sup>a</sup> The daily intake per cage was recorded once per week and divided by the number of mice.

Averages of daily intakes for experimental periods are shown. <sup>b</sup> Blood samples were obtained in the non-fasting state. <sup>c</sup> The stimulation index (SI) is expressed as fluorescence from concanavalin A-stimulated wells / fluorescence from non-stimulated wells. HFD, high-fat diet; HFD-Gln, high-fat diet supplemented with glutamine.

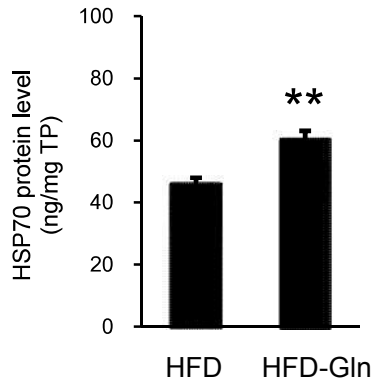


**Table 2-5****Comparison of cytokine levels of adipose tissues and splenocytes of the HF-fed mice and HFD-Gln-fed mice.**

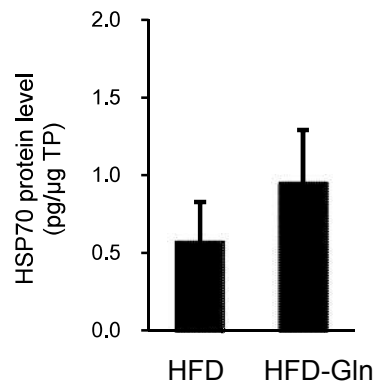
|   | HFD         | HFD-Gln     |
|---|-------------|-------------|
| Cytokine levels of adipose tissues <sup>a</sup>             |             |             |
| Leptin (pg/ml/mg AT)  | 142 ± 22    | 111 ± 37    |
| Adiponectin (ng/ml/mg AT)                                   | 1.33 ± 0.13 | 1.58 ± 0.24 |
| IL-6 (pg/ml/mg AT)  | 18.3 ± 2.2  | 27.8 ± 5.7  |
| IL-10 (pg/ml/mg AT)   | 0.55 ± 0.17 | 0.54 ± 0.19 |
| Cytokine levels of ConA-stimulated splenocytes <sup>b</sup> |             |             |
| IFN-γ (ng/ml)   | 17.3 ± 3.1  | 14.7 ± 0.7  |
| IL-2 (ng/ml)  | 3.32 ± 0.44 | 3.60 ± 0.62 |
| IL-4 (pg/ml)  | 42.4 ± 4.7  | 36.4 ± 3.9  |
| IL-10 (pg/ml)   | 280 ± 26    | 274 ± 24    |
| IL-17 (pg/ml)   | 81.6 ± 12.9 | 88.4 ± 30.1 |

Values are expressed as means ± SE. Animals per group:  $n = 5$ . <sup>a</sup> Cytokine concentrations in the culture supernatant of adipose tissue were measured with ELISA and normalized to the accurate wet weights of cultured adipose tissue. <sup>b</sup> Cytokine concentrations in the culture supernatant of ConA-stimulated splenocytes were measured with ELISA. HFD, high-fat diet; HFD-Gln, high-fat diet supplemented with glutamine; AT, adipose tissue; ConA, concanavalin A.

(a)



(b)



(c)

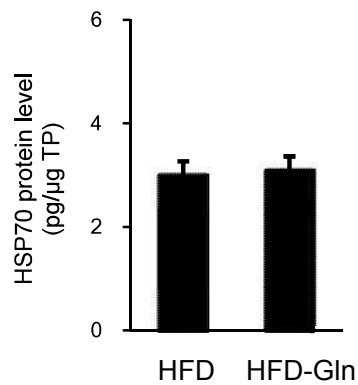


Figure 2-2. Effects of glutamine supplementation on HSP70 protein levels in HFD-fed mice. HSP70 protein levels are expressed as HSP70 concentration (ng/ml) / total protein concentration (mg/ml) values in the homogenized supernatant of epididymal adipose tissues (a), splenocytes without heat shock (b), and splenocytes with heat shock at 42°C (c). Values are expressed as means  $\pm$  SE. \*\* $P < 0.01$ . Animals per group:  $n = 5$ . HFD, high-fat diet; HFD-Gln, high-fat diet supplemented with glutamine; TP, total protein.

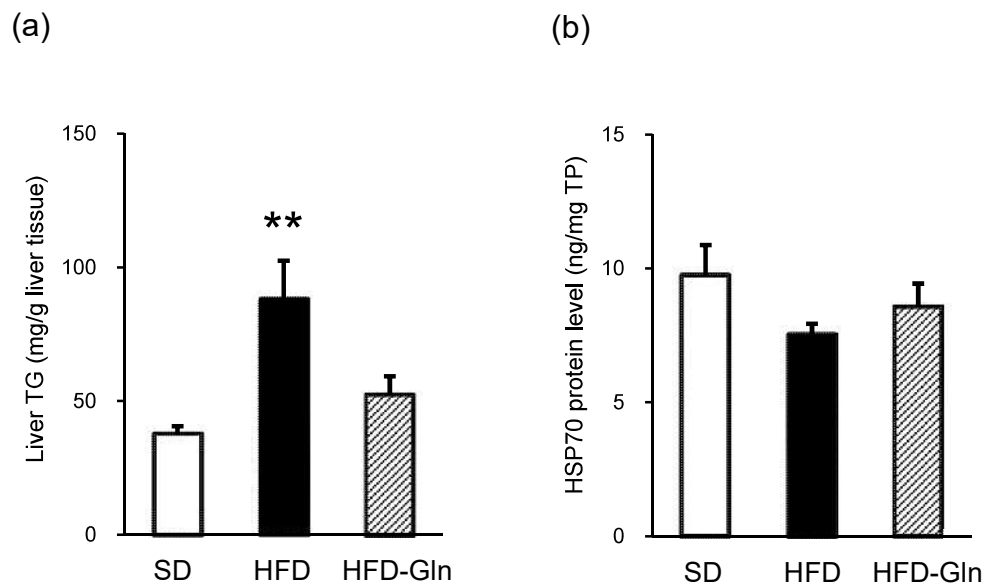


Figure 2-3. Triglyceride levels and HSP70 protein levels of liver tissues. (a) Liver triglyceride levels were determined by normalizing triglyceride levels in the homogenized supernatant to the accurate wet weight of homogenized liver tissue. (b) HSP70 protein levels are expressed as HSP70 concentration (ng/ml) / total protein concentration (mg/ml) values in the homogenized supernatant of the liver. Values are expressed as means  $\pm$  SE. \*\* $P < 0.01$  vs. SD. Animals per group:  $n = 5$ . SD, standard diet; HFD, high-fat diet; HFD-Gln, high-fat diet supplemented with glutamine; TG, triglyceride; TP, total protein.

## 肥満モデルマウスの脂肪組織培養における検討【研究3】

### 1. 緒言

本章研究2により、肥満の脾細胞および脂肪組織における HSP70 レベルの低下傾向が示された。また、グルタミン摂取が脂肪組織の HSP70 レベルを高めることが示され、肥満の脂肪組織において HSP70 およびグルタミンが病態と関連する可能性が示唆された。グルタミンは HSP70 のエンハンサーであることに加え、サイトカイン産生の調節作用など免疫細胞に影響を及ぼす。グルタミン濃度の影響について、培養条件下における検討では、ヒトリンパ球の HSP70 誘導がグルタミン濃度 0.5mM の場合に 2 mM の場合と比較して有意に低いこと<sup>81)</sup>、またマイトジェン刺激したヒト末梢血単核細胞によるサイトカイン産生がグルタミン濃度の違いにより変化することが報告されている<sup>82,83)</sup>。しかしながら、グルタミンが脂肪組織のサイトカイン産生および HSP70 に及ぼす影響についての検討はいまだ十分ではない。

研究3では、肥満の脂肪組織における HSP70 およびグルタミンについて検討するため、脂肪組織培養においてグルタミン濃度の違いが脂肪組織のサイトカインおよび HSP70 レベルに及ぼす影響を検討した。

### 2. 実験方法

#### 2-1. 実験動物および実験プロトコール

5週齢の C57BL/6J 雄マウス（三協ラボサービス）を用いた。マウスは12時間毎の明暗サイクル（消灯時間：午後7時～午前7時）において温度 20～26℃、湿度 30～70%に管理した環境下で飼育した。飼料および蒸留水は自由摂取とした。体重および飼料摂取量を週1回測定した。普通食（AIN-93M 標準飼料、Standard diet ; SD）で馴化飼育を行った後、引き続き普通食を与える非肥満群（Non-obese 群； $n = 10$ ）および高脂肪食（High fat diet ; HFD）を与える肥満群（Obese 群； $n = 10$ ）の2群に分けた。実験飼料の組成を Table 3-1 に示す。9週間の実験食の後に18時間絶食とし、尾静脈より空腹時採血を行った。10週間の実験食の後に解剖を行った。皮下脂肪（鼠径部脂肪）および内臓脂肪（精巣上体脂肪）の重量を測定し、精巣上体脂肪を下記の方法により脂肪組織培養実験に供した。なお、本研究は日本女子大学動物実験委員会の承認のもと、日本女子大学動物実験規程に従い行った。

## 2-2. 血液生化学検査

空腹時採血した血液において、小型血糖測定器グルコカードダイアメーター $\alpha$ （アークレイファクトリー）を用いて血糖値を測定した。血液をヘパリン処理済みガラス毛细管に採取し、遠心分離により得た血漿を解析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。血漿インスリン濃度をレビスインスリン測定用 ELISA キット（シバヤギ）を用いて測定した。インスリン抵抗性の指標として Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) を以下の式により算出した：

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹時インスリン値} (\mu\text{U/ml}) \times \text{空腹時血糖値} (\text{mg/dl}) / 405$$

解剖時に随時採血した血液から遠心分離により血清を採取し、解析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。血清レプチン濃度およびアディポネクチン濃度の測定を DuoSet kit (R&D Systems) を用いて ELISA 法により行った。

## 2-3. 脂肪組織の培養実験

グルタミン濃度を 0.5 mM または 2 mM とした 3 % FBS 含有 DMEM 培地に、内臓脂肪である精巣上体脂肪組織を約 20mg/well で浮遊させた。24 穴平底プレートにて、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 24 時間 (Interleukin (IL) -6、IL-10、レプチンおよびアディポネクチンの測定用) または 72 時間 (Tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  の測定用) 培養した。培養上清を回収し、培養上清中サイトカイン濃度を DuoSet kit (R&D Systems) を用いて ELISA 法により行った。培養上清中サイトカイン濃度を、培養開始時に測定した脂肪組織の重量にて補正した。

## 2-4. HSP70 タンパク質レベル

24 時間培養後の脂肪組織を回収し、プロテアーゼ阻害剤 (complete ; Roche) を添加した T-PER buffer (Thermo Fisher Scientific) 中でペレットペッスル (Kontes) を用いてホモジナイズした。遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、15,000 rpm、5 分間) によりホモジナイズ上清を得た。

ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を ELISA 法による Total HSP70/HSPA1A DuoSet IC kit (R&D Systems)、総タンパク質濃度を BCA (Bicinchoninic Acid) 法による BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を総タンパク質濃度で除した値を脂肪組織 HSP70 タンパク質レベルとした。

## 2-5. 統計解析

データの統計解析には IBM SPSS Statistics 22 (IBM) を使用した。結果を平均値±標準誤差として示す。2 群間の有意差検定には対応のない t 検定を用いた。脂肪組織培養上清中サイトカイン濃度について、肥満およびグルタミン濃度を 2 要因とする二元配置分散分析を行った。有意水準を 5 %とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 体重、脂肪重量および血液生化学検査

高脂肪食により肥満を誘導した肥満群および非肥満群の体重、脂肪重量および血液バイオマーカーを Table 3-2 に示す。

体重、皮下脂肪（鼠径部脂肪）および内臓脂肪（精巣上体脂肪）は、肥満群が非肥満群と比較して有意に高値であった。空腹時の血糖値およびインスリン値もまた肥満群が有意に高値であり、HOMA-IR においても肥満群が有意に高値であった。以上のことから、肥満群においてインスリン抵抗性を伴う肥満の誘導が確認された。

また、肥満群は非肥満群と比較して血清レプチン濃度が有意に高値であり、一方で血清アディポネクチン濃度は有意に低値であった。

#### 3-2. 脂肪組織培養上清中サイトカイン濃度

グルタミンが肥満の脂肪組織によるサイトカイン産生に及ぼす影響を検討するため、0.5 mM または 2 mM の培地中グルタミン濃度において肥満群および非肥満群由来の脂肪組織が分泌するサイトカイン量を検討した (Fig. 3-1)。

肥満により炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6 およびレプチン濃度は有意に高値であった。一方で、アディポネクチン濃度は肥満により有意に減少した。IL-10 濃度においては肥満による有意な変化を認めなかった。グルタミン濃度の影響として、グルタミン濃度が高値であるほど抗炎症性サイトカイン IL-10 量が高いという傾向を認めた ( $P = 0.065$ )。いずれのサイトカインにおいても肥満およびグルタミン濃度の統計学的に有意な交互作用は認めなかった。

#### 3-3. 脂肪組織 HSP70 タンパク質レベル

0.5 mM 培地中グルタミン濃度において培養した脂肪組織の HSP70 タンパク質レベルを Fig. 3-2 に示す。0.5 mM 培地中グルタミン濃度においては肥満群が非肥満群に比し有意に低値であった。2 mM 培地中グルタミン濃度においては 2 群間に有意差を認めなかった (Non-obese 群, 32.8 pg/ $\mu$ g protein ; Obese 群, 32.0 pg/ $\mu$ g protein)

#### 4. 考察

本研究は、グルタミンが肥満の脂肪組織に及ぼす影響を検討するため、脂肪組織培養においてグルタミン濃度の違いが肥満脂肪組織によるサイトカインおよび HSP70 タンパク質レベルに及ぼす影響を検討した。

肥満においては、脂肪細胞の肥大化に伴い、抗炎症作用・インスリン感受性増加作用を有するアディポネクチンの低下等、アディポカイン発現の変化が生じる。さらに、肥満の脂肪組織では炎症を促進する M1 マクロファージ、Th1 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞等が集積し、脂肪細胞と相互作用しながら脂肪組織炎症を拡大する<sup>84)</sup>。本研究の高脂肪食により誘導した肥満モデルマウスの脂肪組織においても、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および IL-6 の増加を認めた。炎症性アディポカインであるレプチンもまた血清レプチン濃度に一致して肥満により増加した。一方で、抗炎症性アディポカインであるアディポネクチンは血清アディポネクチン濃度に一致して肥満により減少した。抗炎症性サイトカインである IL-10 に関して、食餌誘導性肥満マウスの脂肪間質における IL-10 産生の低下が示されている<sup>85)</sup>。一方で、遺伝性肥満ラットにおける検討ではむしろ脂肪組織中 IL-10 発現は増加しており、炎症に対する防御応答である可能性が示唆されている<sup>86)</sup>。本研究において、IL-10 濃度は肥満群と非肥満群とで有意差を認めなかったが、その原因として肥満によって生じる IL-10 産生低下に加えて防御応答としての IL-10 上昇が生じた結果である可能性がある。

グルタミンが脂肪組織サイトカイン産生に及ぼす影響として、グルタミン濃度が高いほど IL-10 産生が上昇する傾向を認めた。肥満脂肪組織では IL-10 等の抗炎症性サイトカインを産生する CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞や M2 マクロファージ等に対し、炎症性免疫細胞が優勢になる<sup>50)</sup>。また、肥満脂肪組織中の制御性 T 細胞では IL-10 発現が低下することが報告されている<sup>87)</sup>。IL-10 は肥満の脂肪組織において過剰産生される TNF- $\alpha$  を阻害し得ることから、本研究によりグルタミンが脂肪組織における IL-10 産生を上昇し、炎症反応を抑制し得る可能性が示唆された。本研究で認めたグルタミンによる IL-10 産生の上昇作用については、ヒト末梢血単核細胞によるサイトカイン産生に及ぼす影響に関する過去の *in vitro* 研究においてグルタミンが IL-10 等のサイトカイン産生を高めたとの報告<sup>82)</sup>と一致する。同報告において、マクロファージ等を刺激する LPS 刺激下での TNF- $\alpha$  産生はグルタミン濃度により変化しなかったとされている。本研究においても、脂肪組織による TNF- $\alpha$  産生はグルタミン濃度の違いによる有意差を認めなかった。しかしながら、Yaqoob らの研究では本研究と同じく 2 mM 以下での検討であったのに対して、



Wischmeyer らによりグルタミン濃度が 4 mM 以上という薬理学的濃度においてヒト末梢血単核細胞による TNF- $\alpha$  産生が抑制されることが報告されており<sup>88)</sup>、薬理学的濃度によつては脂肪組織においても TNF- $\alpha$  産生を抑制し得る可能性がある。

本研究における脂肪組織 HSP70 タンパク質レベルに関する検討では、グルタミン濃度 2 mM では肥満群と非肥満群との間で有意差はなかったのに対して、グルタミン濃度 0.5 mM においては肥満群の脂肪組織 HSP70 タンパク質レベルが有意に低値であり、肥満の脂肪組織における HSP70 発現はグルタミン濃度の影響を受けることが示された。血中グルタミン濃度は約 0.6mM であるが、外傷、感染等により約 0.3~0.5mM に低下する<sup>89)</sup>。肥満に関連する病態においては血中グルタミン濃度が低下しているとの報告もあり<sup>60,61)</sup>、この肥満におけるグルタミンのアベイラビリティの低下が脂肪組織の HSP70 発現の低下につながる可能性が示唆された。また一方で、肥満による HSP70 発現低下のメカニズムの 1 つとして、インスリンシグナル伝達カスケードの低下が HSP 発現の低下につながることを示唆されている<sup>31)</sup>。肥満の脂肪組織においてはインスリン抵抗性により HSP70 発現が低下することにより、HSP70 発現がグルタミンの濃度の影響を受けやすい可能性がある。

HSP70 とサイトカインとの関連について、3T3-L1 脂肪細胞に対して熱ショックを加えた場合、HSP70 発現が上昇し、レプチンおよびアディポネクチン濃度が変化したとの報告がある<sup>90)</sup>。また、HSP70 は NF- $\kappa$ B 活性化の阻害による抗炎症作用などサイトカイン産生に影響を及ぼす<sup>15)</sup>。したがって、本研究において示されたグルタミンと肥満脂肪組織における HSP70 発現の低下との関連により、肥満におけるグルタミンのアベイラビリティの低下による HSP70 発現の低下が、さらに肥満脂肪組織におけるサイトカイン変化と関連する可能性がある。

以上の結果から、脂肪組織における IL-10 産生および HSP70 発現とグルタミンとの関連が示唆された。このことから、肥満の脂肪組織におけるグルタミンのアベイラビリティの変化が IL-10 および HSP70 レベルの変化につながり、病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、グルタミン濃度を十分に維持することは脂肪組織の IL-10 および HSP70 レベルを高めることにより肥満の病態を改善し得る可能性があり、今後さらなる検討が求められる。

## 5. 要旨

本研究は、グルタミンが食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織におけるサイトカインおよび HSP70 に及ぼす影響について脂肪組織培養において検討した。C57BL/6J 雄マウスに 10 週間高脂肪食を与えた群を肥満群 (Obese 群)、普通食を与えた群を非肥満群 (Non-obese 群) とした。肥満群および非肥満群の内臓脂肪組織 (精巣上体脂肪組織) を、グルタミン濃度 0.5 mM または 2 mM とした培地中で培養した。その結果、グルタミン濃度が高いほど脂肪組織培養上清中 IL-10 濃度が高値傾向であった。0.5 mM グルタミン濃度で培養した場合、脂肪組織 HSP70 タンパク質レベルが肥満群において低値であった。以上の結果から、肥満におけるグルタミンのアベイラビリティの変化により脂肪組織の IL-10 レベルおよび HSP70 レベルが変化し、病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

**Table 3-1****Diet compositions**

| Ingredient (g/kg diet)         | SD       | HFD      |
|--------------------------------|----------|----------|
| Cornstarch                     | 465.7    | 175.7    |
| $\alpha$ -Cornstarch           | 155      | 155      |
| Sucrose                        | 100      | 100      |
| Cellulose                      | 50       | 50       |
| Casein                         | 140      | 140      |
| Cystine                        | 1.8      | 1.8      |
| Soybean oil                    | 40       | 40       |
| Lard                           | 0        | 290      |
| AIN-93M mineral mix            | 35       | 35       |
| AIN-93 vitamin mix             | 10       | 10       |
| Choline bitartrate             | 2.5      | 2.5      |
| <i>tert</i> -Butylhydroquinone | 0.008    | 0.008    |
| Energy (kcal/100g)             | 349      | 519      |
| P:F:C (% of energy)            | 15:11:74 | 10:60:30 |

SD, standard diet; HFD, high-fat diet; AIN-93, American Institute of Nutrition-93; P:F:C, protein, fat, and carbohydrate.

**Table 3-2****Body weight, fat pad weight, and blood biomarker**

|                                      | Non-obese   | Obese         |
|--------------------------------------|-------------|---------------|
| Body weight (g)                      | 35.2 ± 0.8  | 42.2 ± 1.1**  |
| Fat pad weight (g)                   |             |               |
| Subcutaneous fat                     | 0.26 ± 0.02 | 0.48 ± 0.04** |
| Epididymal fat                       | 1.36 ± 0.08 | 2.09 ± 0.04** |
| Blood biomarker                      |             |               |
| Blood glucose (mg/dl) <sup>a</sup>   | 78 ± 4      | 103 ± 7**     |
| Plasma insulin (μIU/ml) <sup>a</sup> | 11.1 ± 2.4  | 31.8 ± 4.9**  |
| HOMA-IR <sup>a</sup>                 | 2.27 ± 0.62 | 8.76 ± 2.02*  |
| Serum leptin (ng/ml)                 | 18.7 ± 0.9  | 22.9 ± 0.6**  |
| Serum adiponectin (μg/ml)            | 7.19 ± 0.25 | 6.09 ± 0.25** |

Values for the non-obese mice ( $n = 10$ ) and obese mice ( $n = 10$ ) are expressed as means ± SE. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ . <sup>a</sup> The blood biomarkers in the fasting mice were measured after 9 weeks of the experimental diets.

HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.

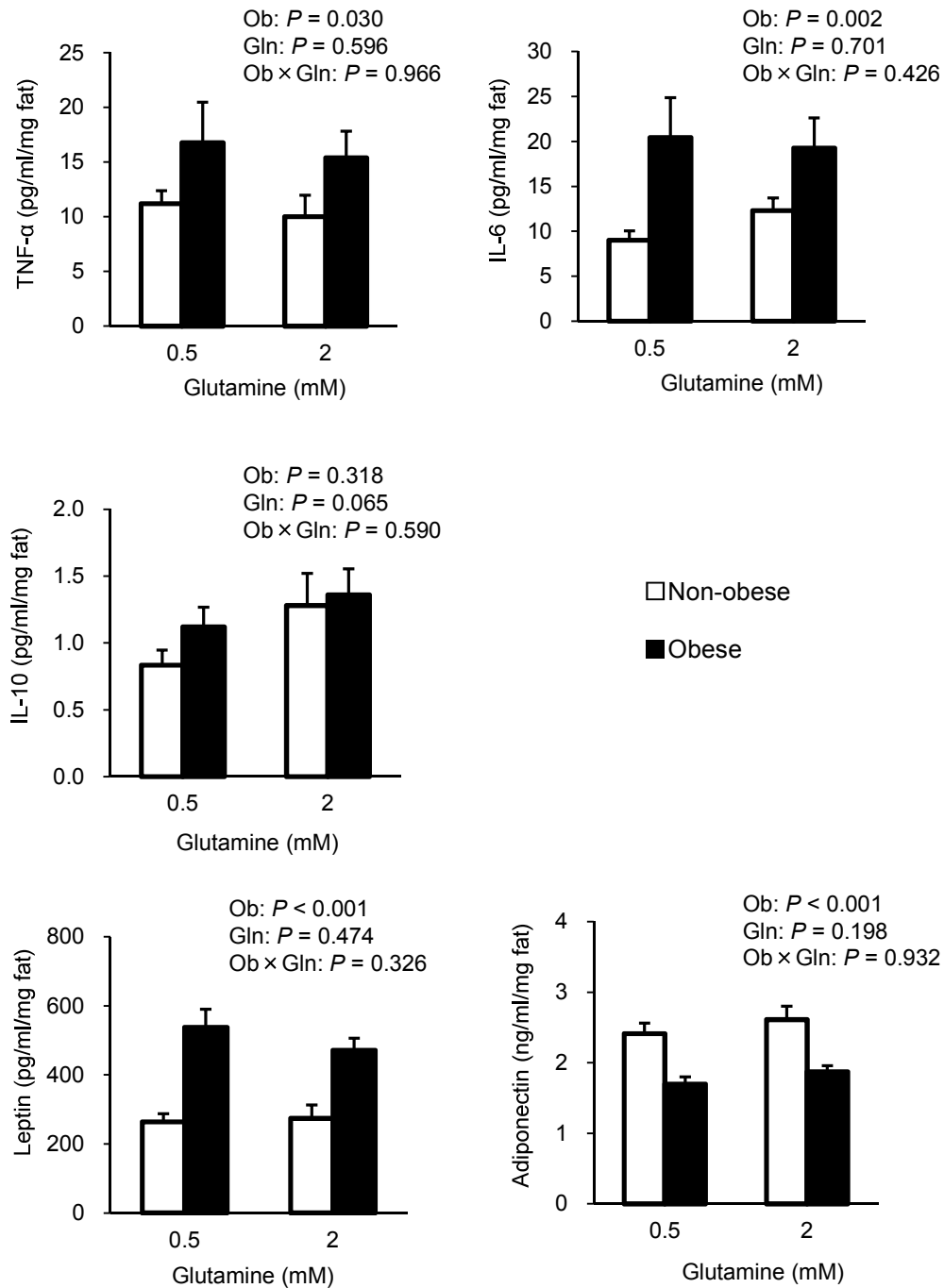


Figure 3-1 Effects of glutamine concentrations on cytokine secretion by adipose tissue from the obese mice and non-obese mice. The adipose tissues were cultured at a glutamine concentration of 0.5 mM or 2 mM. The amount of cytokine secreted by the adipose tissues are expressed as the concentration of the cytokine in the culture supernatant / the weight of the cultured adipose tissue. Values for non-obese mice ( $n = 10$ , white bars) and obese mice ( $n = 10$ , black bars) are expressed as means  $\pm$  SE. Two-way ANOVA results of the effects of obesity (Ob), effect of glutamine(Gln), and their interaction effect (Ob  $\times$  Gln) are shown in the upper right.

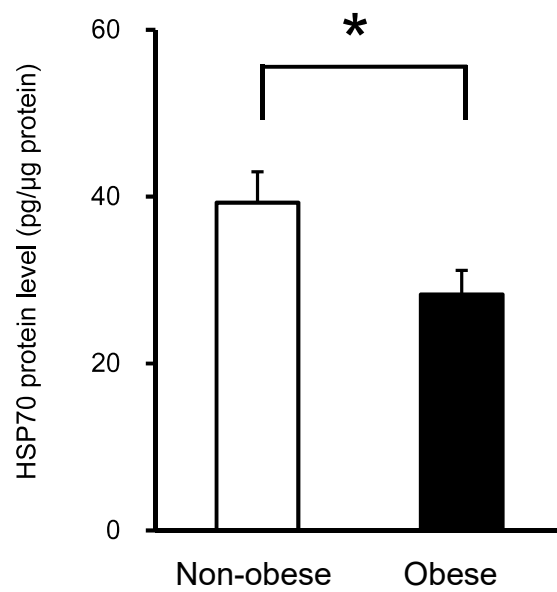


Figure 3-2 HSP70 protein levels in the adipose tissue cultured under the condition of 0.5 mM glutamine. The HSP70 protein levels are expressed as HSP70 concentration (pg/ml) / total protein concentration (μg/ml) in the homogenized supernatant of the adipose tissue. Values for non-obese mice ( $n = 10$ , white bars) and obese mice ( $n = 10$ , black bars) are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$ .

### 第3章 2型糖尿病の免疫機能および熱ショックタンパク質における免疫栄養素の影響 [研究4]

#### 1. 緒言

2型糖尿病は、インスリン分泌低下やインスリン抵抗性をきたす複数の遺伝因子に肥満等の環境因子が加わりインスリン作用不足を生じて発症する慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患である<sup>91)</sup>。2型糖尿病は糖尿病に特徴的な慢性合併症である網膜症、腎症、神経障害に加え、冠動脈疾患などの動脈硬化性疾患のリスクとなる<sup>92)</sup>。動脈硬化において免疫細胞は炎症の促進等により病変形成に関与している<sup>93)</sup>。肥満による脂肪組織の慢性炎症性変化は全身のインスリン抵抗性に関与する<sup>50)</sup>。膵臓においては、炎症性のM1マクロファージが集積し膵島炎を生じることにより膵β細胞機能障害に関与することが2型糖尿病モデルマウスにおいて示されている<sup>94)</sup>。また、高血糖状態は免疫機能の低下等につながり、糖尿病患者において血糖コントロール不良は感染症罹患のリスクファクターとなる<sup>95)</sup>。

一方で、種々の栄養素や食品成分の免疫機能への作用、ならびに免疫系を介した病態との関連について明らかにされてきている<sup>17)</sup>。免疫栄養療法において特に検討がなされてきているアルギニン、グルタミンに加え、種々のアミノ酸が免疫系に作用し得ることが示されてきている<sup>96)</sup>。また、耐糖能異常や2型糖尿病の症例において血中アミノ酸濃度が変化することが指摘されている<sup>61)</sup>。

Heat shock protein 70 (HSP70) は、ストレス負荷時に合成が顕著に誘導され、細胞防御作用を有することから、HSP70誘導による臓器障害の抑制などについて研究がなされている<sup>97)</sup>。2型糖尿病との関連においては、2型糖尿病罹患者の筋肉組織でHSP70発現の低下していること<sup>29)</sup>、2型糖尿病サルにおいてHSP70発現が肝臓において低値傾向、膵臓においては高値であること<sup>12)</sup>等が報告されている。HSP70発現を上昇させることによりインスリン抵抗性が改善されることも報告されている<sup>62)</sup>。また、HSP70はサイトカイン産生を含む免疫機能および炎症にも関与することから、HSP70発現の変化が免疫系を含めた糖尿病の種々の病態に関与する可能性がある。

本研究では、2型糖尿病型モデルマウスにおいて、免疫系に作用し得るアミノ酸であるアルギニンおよびグリシンの摂取が免疫機能およびHSP70発現に及ぼす影響を検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 実験動物

実験には3週齢の C57BL/6J 雄マウス（三協ラボサービス）を用いた。マウスは12時間毎の明暗サイクル（消灯時間：午後7時～午前7時）において温度 20～26℃、湿度 30～70%に管理した環境下で飼育した。飼料および蒸留水は自由摂取とした。体重および飼料摂取量を週1回測定した。なお、本研究は日本女子大学動物実験委員会の承認のもと、日本女子大学動物実験規程に従った。

### 2-2. 実験プロトコール

普通食（AIN-93G 標準飼料、Standard diet ; SD）で1週間馴化飼育を行った後、Luoらの方法<sup>98)</sup>に準じて2型糖尿病型モデルマウスの誘導を行った。2型糖尿病の病態を誘導する群（ $n=30$ ）に対しては、3週間の高脂肪食（High fat diet ; HFD）を摂取させ、その後にクエン酸緩衝液に溶解したストレプトゾトシン（Streptozotocin ; STZ）（Sigma Aldrich）を 100mg/体重 kg の用量で腹腔内投与した。糖尿病を誘導しない群に対しては普通食を続け、クエン酸緩衝液のみを投与した（Non-DM 群； $n=10$ ）。

2型糖尿病の病態を誘導した群を STZ 投与の4週間後に無作為に3群に分け、以下の実験食を開始した： HFD 食、2%アルギニン（Arginine ; Arg）を添加した高脂肪食（HFD-Arg 食）、または3.4%グリシン（Glycine ; Gly）を添加した高脂肪食（HFD-Gly 食）。それぞれの群を DM 群、DM+Arg 群、DM+Gly 群とした（各群  $n=10$ ）。実験飼料の組成を Table 4-1 に示す。アルギニンはアルギニン塩酸塩の形態で添加した。アルギニンおよびグリシンが及ぼす影響を検討するため、実験食開始時に DM 群、DM+Arg 群および DM+Gly 群の3群間において体重、血糖値および血漿インスリン濃度に有意差のないことを確認した。2週間の実験食の後に解剖を行った。下記の方法によって各解析を行った。

### 2-3. 臓器重量

皮下脂肪（鼠径部脂肪）、内臓脂肪（精巣上体脂肪）、膵臓、胸腺、脾臓、肝臓および腎臓の重量を測定した。胸腺、肝臓および腎臓を解析まで-80℃で保存した。

### 2-4. 血液生化学検査

2型糖尿病の病態を誘導した群を実験食の3群に分ける際に、4時間の絶食の後に尾静



脈より採血した血液の血糖値および血漿インスリン濃度を測定した。血糖値を小型血糖測定器グルコカードダイアメーター  $\alpha$  (アークレイファクトリー) で測定した。血液をヘパリン処理済みガラス毛細管に採取し、遠心分離により得た血漿のインスリン濃度をレビスインスリン測定用 ELISA キット (シバヤギ) を用いて測定した。

解剖時の随時採血において、血糖値を小型血糖測定器グルコカードダイアメーター  $\alpha$  (アークレイファクトリー) で測定した。遠心分離により血清を採取し、解析まで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。血清インスリン濃度をレビスインスリン測定用 ELISA キット (シバヤギ) を用いて測定した。血清中の一酸化窒素 (Nitric oxide ; NO) の濃度を血清中の  $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NO}_3^-$  の総量として測定した (血清 NOx 濃度)。測定には Griess 反応による Total Nitric Oxide Assay Kit (Stressgen) を用いた。

## 2-5. 脾臓単核球培養実験

脾臓より、研究 1 と同様に 5 % FBS 含有 RPMI1640 培地に細胞浮遊液を調製した。脾細胞を  $5 \mu\text{g/ml}$  Concanavalin A (ConA, Sigma) または  $10 \mu\text{g/ml}$  Lipopolysaccharide (LPS, Sigma) の存在下で  $37^{\circ}\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて培養した。

脾臓リンパ球幼若化反応の測定は、96 穴平底プレート中  $5 \times 10^5$  cells/well での 72 時間の培養後、Alamar Blue 法によって測定した<sup>34)</sup>。Alamar Blue (Biosource) を  $10 \mu\text{l/well}$  添加し、さらに 3 時間培養した後に 544/590nm で蛍光強度を測定し、Stimulation Index (SI ; 下式) として評価した :

$$\text{SI} = (\text{ConA 刺激下での蛍光強度} - \text{無刺激下での蛍光強度}) / \text{無刺激下での蛍光強度}$$

脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度の測定のため、24 穴平底プレート中  $5 \times 10^6$  cells/well で 48 時間培養し、遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、3,000rpm、10 分間) により上清を得た。回収した上清は解析まで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。サイトカイン濃度の測定は DuoSet kit (R&D Systems) を用いて ELISA 法にて行った。ConA 刺激下での培養上清において Interferon (IFN) -  $\gamma$ 、Interleukin (IL) -2、IL-4、および IL-10、LPS 刺激下の培養上清において Tumor necrosis factor (TNF) -  $\alpha$  を測定した。

## 2-6. HSP70 タンパク質レベル

胸腺、肝臓および腎臓を、プロテアーゼ阻害剤 (complete; Roche) を添加したバッファ (10mM Tris-HCl、10mM NaCl、0.1mM EDTA、1 % TritonX-100) 中でホモジナ

イザー (Polytron PT1300D、Kinematica) を用いてホモジナイズし、4℃、3500rpm、20 分間および 4℃、15000rpm、20 分間で 2 回遠心分離することによりホモジナイズ上清を得た。

ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を ELISA 法により以下のように測定した。0.05M 炭酸バッファーで希釈した Mouse Anti-HSP70 Monoclonal Antibody (Stressgen) を 4℃で一晩固相化した後、洗浄に 0.05%Tween 20 含有 PBS (T-PBS) を用い、0.1%BSA 含有 T-PBS でブロッキングした。サンプルおよび標準としての Recombinant Mouse HSP70-A2 Protein (Stressgen) を加えて 37℃で 2 時間静置した。Hsp70 Polyclonal Antibody (Stressgen)、続いて Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti Rabbit IgG ·Horseradish Peroxidase (Leinco Technologies) と反応させた。基質として ABTS Peroxidase Substrate System (Kirkegard & Perry Laboratories) を用い、405nm で吸光度を測定した。

ホモジナイズ上清中の総タンパク質濃度を BCA 法による BCA Protein Assay Kit (Pierce) を用いて測定し、ホモジナイズ上清中の HSP70 濃度を総タンパク質濃度で除した値を HSP70 タンパク質レベルとした。

## 2-7. 統計解析

結果を平均値±標準誤差または平均値として示す。実験食開始時の DM 群、DM+Arg 群および DM+Gly 群の比較を一元配置分散分析により行った。Non-DM 群と DM 群の比較には、正規性のある場合には t 検定、正規性のない場合には Mann-Whitney U 検定を用いた。DM 群、DM+Arg 群および DM+Gly 群の比較は、DM 群を対照群として Dunnett 検定により行った。統計学的処理に SPSS 16.0 Base System (SPSS, Inc.) を使用し、有意水準を 5%とした。DM+Gly 群のうち、実験食開始前の STZ 投与 6 日後の測定で極端な体重減少および血糖値の低下を認めた 1 匹は解析から除いて検定を行った。

### 3. 結果

#### 3-1. 2型糖尿病型モデルマウスの誘導

2型糖尿病の病態を誘導した群（DM 群、DM+Arg 群および DM+Gly 群）ならびに誘導していない群（Non-DM 群）の実験食開始時の特徴を Table 4-2 に示す。先行研究に基づく高脂肪食および STZ 投与による 2型糖尿病型病態の誘導法により、軽度肥満によるインスリン抵抗性、ならびに少量ストレプトゾトシンでの膵β細胞の傷害による軽度のインスリン分泌低下が生じ、インスリンの相対的な不足を特徴とする病態が誘導される<sup>98)</sup>。Non-DM 群と DM 群の 2 群間の比較から、体重およびインスリン濃度においては 2 群間に有意差がない一方で、血糖値は DM 群が Non-DM 群と比較して有意に高値であった。よって、本研究においてもインスリン濃度の有意な変化は示さず高血糖を呈する 2型糖尿病型モデルが誘導された。

#### 3-2. 実験食摂取量

2型糖尿病の病態を誘導した 3 群の実験食期間中の実験食摂取量等について Table 4-3 に示す。高脂肪食へのアルギニンまたはグリシンの添加による摂食量および摂取エネルギー量の大きな変化はなかった。DM+Arg 群および DM+Gly 群の食餌へのアミノ酸添加による窒素付加量に大きな差は認められなかった。

#### 3-3. 体重および臓器重量

体重および体重で補正した臓器重量を Table 4-4 に示す。DM 群は Non-DM 群と比較して体重ならびに皮下脂肪、内臓脂肪および肝臓の重量が有意に高値であった。一方で、腎臓重量は糖尿病誘導により有意に低下したが、アルギニン添加食により有意に増加した。免疫臓器である胸腺および脾臓ならびにその他の臓器（脂肪、膵臓および肝臓）の重量について、アルギニンまたはグリシン添加食による影響は認められなかった。

#### 3-4. 血液生化学検査

実験食摂取後の血糖値、血清インスリン濃度および血清 NOx 濃度を Table 4-5 に示す。DM 群は Non-DM 群に比し、血糖値および血清 NOx 濃度が有意に高値であった。血清インスリン濃度においては 2 群間に有意差はなかった。アルギニンまたはグリシン添加食による影響は 3 つのいずれの項目においても認められなかった。

### 3-5. 脾臓単核球培養実験

免疫機能評価のため、脾臓リンパ球幼若化反応 (Fig. 4-1) および脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度 (Fig. 4-2) の測定を行った。

T細胞マイトジェンである ConA 刺激下での脾臓リンパ球幼若化反応では、2型糖尿病病態の誘導による影響、アミノ酸添加食による影響のいずれも認めなかった。

脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度の結果では、DM 群は Non-DM 群と比較して IFN- $\gamma$  濃度において高値、IL-4 濃度において低値であった。IFN- $\gamma$  濃度においてはいずれのアミノ酸の影響も認めなかった。一方で、IL-4 濃度において、DM+Gly 群は DM 群に比して有意に高値であった。なお、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-10 濃度においては2型糖尿病誘導およびアミノ酸添加食のいずれの影響も認めなかった。

### 3-6. HSP70 タンパク質レベル

胸腺、肝臓および腎臓のホモジナイズ上清中 HSP70 濃度を総タンパク質濃度で補正した値を HSP70 タンパク質レベルとして比較した (Fig. 4-3)。免疫臓器である胸腺において DM+Gly 群が DM 群に比し高値であったが、統計学的な有意差はなかった。肝臓においては DM 群が Non-DM 群と比較して低値であった。一方で、アミノ酸添加食による影響は認められなかった。腎臓においては、2型糖尿病誘導、アミノ酸添加食による HSP70 タンパク質レベルの有意な変化は認めなかった。

#### 4. 考察

本研究では、高脂肪食およびストレプトゾトシン投与によってインスリンの相対的な不足により高血糖を呈する2型糖尿病型モデルマウスを誘導し、免疫調節作用を有するアミノ酸であるアルギニンおよびグリシンの摂取が2型糖尿病における免疫機能およびHSP70発現に及ぼす影響を検討した。

免疫機能として、脾臓および胸腺の重量、脾臓リンパ球幼若化反応ならびに脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度を測定した。2型糖尿病患者においてはT細胞マイトジェンによるリンパ球幼若化反応が低下することが報告されている<sup>99)</sup>。また、近年、2型糖尿病は、免疫細胞の機能変化を伴う慢性炎症性病変としての側面が注目されており<sup>100)</sup>、2型糖尿病患者において、TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインの上昇<sup>100)</sup>、ならびに炎症性のTh1/Th17型サイトカインであるIFN- $\gamma$ およびIL-17の産生能の上昇<sup>101)</sup>などが報告されている。本研究での2型糖尿病の病態の誘導においては、脾臓および胸腺重量の変化、脾臓リンパ球幼若化反応の変化等は認められなかったが、脾臓単核球によるIFN- $\gamma$ 産生の増強およびIL-4産生の低下が認められ、サイトカインバランスへの影響が示された。2型糖尿病などのインスリン抵抗性状態ではNO依存性血管拡張能が障害され、高血圧などの発症に関連しているとの報告がある一方で、動脈硬化を伴う2型糖尿病患者ではNO産生量が増加していたとの報告がある<sup>102)</sup>。本研究の糖尿病の誘導では血清NOx濃度の上昇が認められたことから、誘導された2型糖尿病モデルは、特に炎症状態を反映したモデルであると考えられる。

アルギニンは、免疫賦活作用、創傷治癒促進作用を有することが報告されてきており、直接的に、あるいはNO合成酵素によるNO産生の基質となること、インスリン、成長ホルモン、プロラクチンなどホルモン分泌を刺激することなどの作用を介してT細胞分化・成熟を亢進し、機能改善する作用を有する<sup>103)</sup>。しかし、本研究のアルギニン添加食では、体重、血糖値、血清インスリン濃度および血清NOx濃度への影響は認められなかった。また、免疫機能指標として胸腺および脾臓の重量、脾臓リンパ球幼若化反応、脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度を測定したが、そのいずれにおいてもアルギニンによる有意な変化は認められなかった。ストレプトゾトシン50mg/体重kgの単回投与により糖尿病を誘導したラットにおける先行研究では、アルギニン補給は血漿インスリン濃度および内皮NO合成を高め、体重および血糖値が低下したことが報告されている<sup>104)</sup>。また、同様の糖尿病モデルラットにおいて、糖尿病群は対照群と比較してT細胞マイトジェンによるリンパ球幼若化反応が低下し、アルギニンを投与した糖尿病群ではその低下が改善さ

れたことが示されている<sup>105)</sup>。本研究で用いた糖尿病誘導方法は2型糖尿病モデルを誘導する方法であるのに対して、上記2報は1型糖尿病モデルを誘導する方法であることから、アルギニンの効果は病態間で異なる可能性が考えられる。また、Liuらの検討<sup>105)</sup>では2%アルギニン水を8週間投与しており、本研究のアルギニン投与期間は2週間であることから、投与期間の差による可能性も考えられる。本研究において、体重あたりの腎臓重量は糖尿病誘導により減少したが、アルギニン添加食により有意に増加した。糖尿病性腎症を含む腎臓疾患に対してアルギニンが保護効果を有する可能性が示唆されており<sup>106)</sup>、病理組織学的な検討は行っていないが、本研究においても同様の効果が得られた可能性がある。Lucottiらの2型糖尿病患者における検討<sup>107)</sup>では、低カロリー食および運動プログラムによる病態の改善に加えてアルギニンを摂取したことによりグルコース代謝およびインスリン感受性の改善が報告されている。これらのことから、アルギニンが2型糖尿病において免疫機能を含む病態に影響を及ぼす可能性があり、今後さらに、2型糖尿病の誘導期間およびアルギニン投与期間を変更した検討が求められる。

グリシンは、LPSで刺激したマクロファージにおいてスーパーオキシド、IL-1 およびTNF- $\alpha$ の産生を抑制したとの報告<sup>108)</sup>、致死量のLPSを投与したラットに5%グリシン添加食を与えた場合、血中TNF- $\alpha$ 濃度が低下し、生存率が高まったとの報告<sup>109)</sup>など、近年新たに抗炎症効果、免疫調節効果および細胞保護効果が注目されてきているアミノ酸である<sup>96)</sup>。本研究のグリシン添加食は、アルギニン添加食と同様に体重、血糖値および血清インスリン濃度への影響を認めなかった。しかしながら、グリシン添加食による窒素量摂取はアルギニン添加食による窒素量摂取とほぼ同量であるにもかかわらず、グリシン添加食は2型糖尿病誘導によって低下したIL-4産生を有意に増強させた。IL-4はB細胞から形質細胞への分化を促進することで抗体産生を高める作用を有する<sup>35)</sup>。また、IL-4はTh2型サイトカインとしても知られており、マクロファージからの炎症性サイトカイン分泌を阻害するなど抗炎症性サイトカインとしても重要である<sup>110)</sup>。これらのことから、2型糖尿病においてグリシンがサイトカイン産生への影響を介して免疫機能および炎症状態に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究におけるグリシン添加食はIFN- $\gamma$ 産生に対する影響を認めなかったが、Cruzらの2型糖尿病患者における検討では3ヶ月間のグリシン摂取により血中IFN- $\gamma$ が増加したことを報告している<sup>111)</sup>。本研究で誘導した糖尿病ではIFN- $\gamma$ 産生の増加は炎症病態を反映していると考えられるが、細胞性免疫能の低下をより反映する糖尿病モデルにおいてはグリシンがIFN- $\gamma$ 産生を増加し得る可能性がある。

本研究ではさらに、アルギニンおよびグリシンの及ぼす影響について **HSP70** 発現の観点からも検討を行った。近年、肥満および2型糖尿病のようなインスリン抵抗性の病態において **HSP70** 発現が変化していることが報告されている<sup>12,29)</sup>。本研究においても2型糖尿病誘導により肝臓の **HSP70** タンパク質レベルの低下が認められた。また一方で、温熱処置や薬剤などにより **HSP70** 発現を増強させ病態を改善させることが検討されてきている<sup>13,112)</sup>。本研究のアルギニンおよびグリシンの添加食による **HSP70** タンパク質レベルの検討では、統計学的に有意な影響ではないものの、肝臓においてはアルギニン添加食群およびグリシン添加食群で **HSP70** タンパク質レベルが低値であり、胸腺においてはグリシン添加食群で **HSP70** レベルが高値であった。グリシンによる炎症抑制、免疫機能への影響が **HSP70** 発現の変化と関係している可能性があり、より長期間のグリシン投与によるさらなる検討が求められる。

以上の結果から、高脂肪食およびストレプトゾトシン投与により誘導した2型糖尿病型モデルマウスにおいて、アルギニンおよびグリシンによる **HSP70** タンパク質レベルへの有意な影響は明らかではなかったが、グリシンによる **IL-4** 産生の上昇、すなわちサイトカインバランスへの影響が認められ、免疫調節作用を有するアミノ酸が免疫機能および炎症の視点から2型糖尿病の病態を調節し得る可能性が示された。

## 5. 要旨

高脂肪食およびストレプトゾトシン投与によってインスリンの相対的な不足により高血糖を呈する2型糖尿病型モデルマウスにおいて、アルギニンおよびグリシンの摂取が2型糖尿病における免疫機能およびHSP70発現に及ぼす影響を検討した。2型糖尿病型モデルマウスを3群に分け、高脂肪食のみを与えるDM群、高脂肪食+2%アルギニン添加食を与えるDM+Arg群、高脂肪食+3.4%グリシン添加食を与えるDM+Gly群とした。糖尿病を誘導しない群(Non-DM群)では標準飼料およびバッファーのみの投与とした。2週間の実験食の後、T細胞マイトジェン刺激下での脾臓単核球培養上清中サイトカイン濃度において、DM群はNon-DM群と比較してIFN- $\gamma$ 濃度が高値、IL-4濃度が低値を示した。DM+Gly群はDM群に比してIL-4濃度が高値であった。アルギニンおよびグリシン摂取によるHSP70発現への有意な影響は明らかではなかった。本研究により、2型糖尿病においてグリシンがサイトカインバランスへの影響を介して免疫機能および炎症状態を調節し得る可能性が示された。



**Table 4-1****Diet compositions.**

| Ingredient (g/kg diet)         | SD    | HFD   | HFD-Arg | HFD-Gly |
|--------------------------------|-------|-------|---------|---------|
| Casein                         | 200   | 200   | 200     | 200     |
| Cystine                        | 3     | 3     | 3       | 3       |
| Arginine hydrochloride         | 0     | 0     | 24.2    | 0       |
| Glycine                        | 0     | 0     | 0       | 34      |
| Cornstarch                     | 397   | 137   | 112.8   | 103     |
| $\alpha$ -Cornstarch           | 132   | 132   | 132     | 132     |
| Sucrose                        | 100   | 100   | 100     | 100     |
| Cellulose                      | 50    | 50    | 50      | 50      |
| Soybean oil                    | 70    | 70    | 70      | 70      |
| Lard                           | 0     | 260   | 260     | 260     |
| AIN-93G Vitamin Mix            | 10    | 10    | 10      | 10      |
| AIN-93G Mineral Mix            | 35    | 35    | 35      | 35      |
| Choline bitartrate             | 2.5   | 2.5   | 2.5     | 2.5     |
| <i>tert</i> -Butylhydroquinone | 0.014 | 0.014 | 0.014   | 0.014   |
| Energy (kcal/100g)             | 367   | 520   | 519     | 521     |

SD, standard diet; HFD, high-fat diet; Arg, arginine; Gly, glycine; AIN-93, American Institute of Nutrition-93.

**Table 4-2**

**Animal characteristics at the beginning of each experimental diet.**

|                                      | Non-DM        | DM                    | DM + Arg      | DM + Gly      |
|--------------------------------------|---------------|-----------------------|---------------|---------------|
| Body weight (g)                      | 25.1 ± 0.4    | 26.0 ± 0.5            | 25.1 ± 0.4    | 24.9 ± 0.7    |
| Blood glucose (mg/dl) <sup>1)</sup>  | 134 ± 8       | 224 ± 14 <sup>a</sup> | 225 ± 26      | 240 ± 32      |
| Plasma insulin (ng/ml) <sup>1)</sup> | 0.401 ± 0.078 | 0.557 ± 0.093         | 0.633 ± 0.207 | 0.572 ± 0.183 |

Values are expressed as means ± SE. <sup>a</sup>  $P < 0.01$  vs. Non-DM. Animals per group:  $n = 10$ .

<sup>1)</sup> Blood samples were obtained after 4 hours of fasting. DM, diabetes mellitus; Arg, arginine; Gly, glycine.

**Table 4-3****Food and nitrogen intake for the period of experimental diet.**

|                                       | DM   | DM + Arg | DM + Gly |
|---------------------------------------|------|----------|----------|
| Food intake (g/day)                   | 6.2  | 5.8      | 5.7      |
| Energy intake (kcal/day)              | 32.2 | 29.8     | 29.5     |
| Nitrogen intake (g/day) <sup>1)</sup> | —    | 0.037    | 0.036    |

Values are expressed as average intake per cage. <sup>1)</sup> The amount of nitrogen in ingested supplemental amino acid are shown. DM, diabetes mellitus; Arg, arginine; Gly, glycine.

**Table 4-4****Body weight and organ weight.**

|                                 | Non-DM      | DM                       | DM + Arg                | DM + Gly    |
|---------------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------|
| Body weight (g)                 | 26.6 ± 0.3  | 28.5 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 27.3 ± 0.6              | 27.9 ± 0.9  |
| Organ weight (mg/g body weight) |             |                          |                         |             |
| Subcutaneous fat                | 5.05 ± 0.33 | 6.82 ± 0.54 <sup>a</sup> | 6.48 ± 0.31             | 6.82 ± 0.56 |
| Epididymal fat                  | 21.5 ± 1.9  | 32.8 ± 1.6 <sup>b</sup>  | 28.4 ± 1.9              | 32.2 ± 2.4  |
| Pancreas                        | 4.89 ± 0.15 | 4.84 ± 0.20              | 4.80 ± 0.18             | 4.68 ± 0.21 |
| Thymus                          | 1.44 ± 0.04 | 1.37 ± 0.03              | 1.39 ± 0.06             | 1.38 ± 0.07 |
| Spleen                          | 2.43 ± 0.08 | 2.51 ± 0.11              | 2.45 ± 0.12             | 2.53 ± 0.16 |
| Liver                           | 40.2 ± 0.8  | 43.0 ± 0.9 <sup>a</sup>  | 42.2 ± 1.0              | 43.3 ± 0.8  |
| Kidney                          | 10.7 ± 0.2  | 9.7 ± 0.1 <sup>b</sup>   | 10.3 ± 0.2 <sup>c</sup> | 9.9 ± 0.2   |

Values are expressed as means ± SE. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs. Non-DM; <sup>c</sup>  $P < 0.05$  vs. DM. Animals per group:  $n = 9-10$ . DM, diabetes mellitus; Arg, arginine; Gly, glycine.

**Table 4-5****Blood biomarker.**

|                       | Non-DM        | DM                      | DM + Arg      | DM + Gly      |
|-----------------------|---------------|-------------------------|---------------|---------------|
| Blood glucose (mg/dl) | 220 ± 15      | 305 ± 14 <sup>a</sup>   | 327 ± 23      | 348 ± 40      |
| Serum insulin (ng/ml) | 1.333 ± 0.286 | 2.127 ± 0.420           | 1.512 ± 0.334 | 1.253 ± 0.318 |
| Serum NOx (μM)        | 33.4 ± 3.0    | 53.9 ± 6.7 <sup>a</sup> | 44.7 ± 2.1    | 39.2 ± 2.7    |

Values are expressed as means ± SE. <sup>a</sup>  $P < 0.01$  vs. Non-DM. Animals per group:  $n = 9-10$ . Blood samples were obtained in the non-fasting state. DM, diabetes mellitus; Arg, arginine; Gly, glycine.

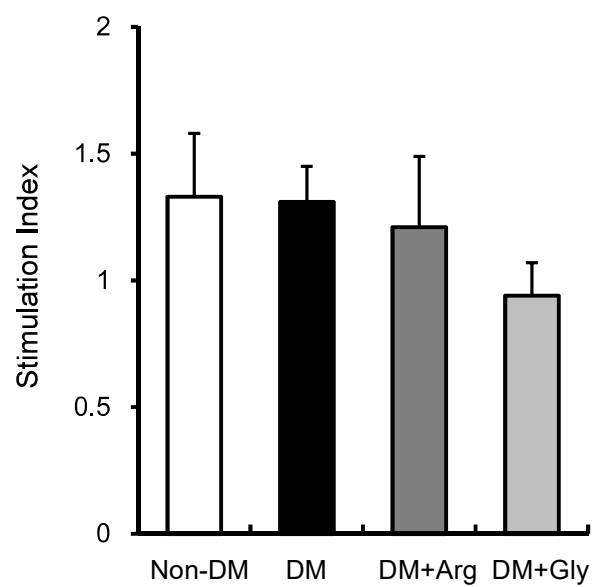


Figure 4-1. Proliferative response of ConA-stimulated splenocytes. The stimulation index is expressed as (fluorescence from ConA-stimulated wells - fluorescence from non-stimulated wells) / fluorescence from non-stimulated wells. Values are expressed as means  $\pm$  SE. Animals per group:  $n = 9-10$ . DM, diabetes mellitus; Arg, arginine; Gly, glycine; ConA, concanavalin A.

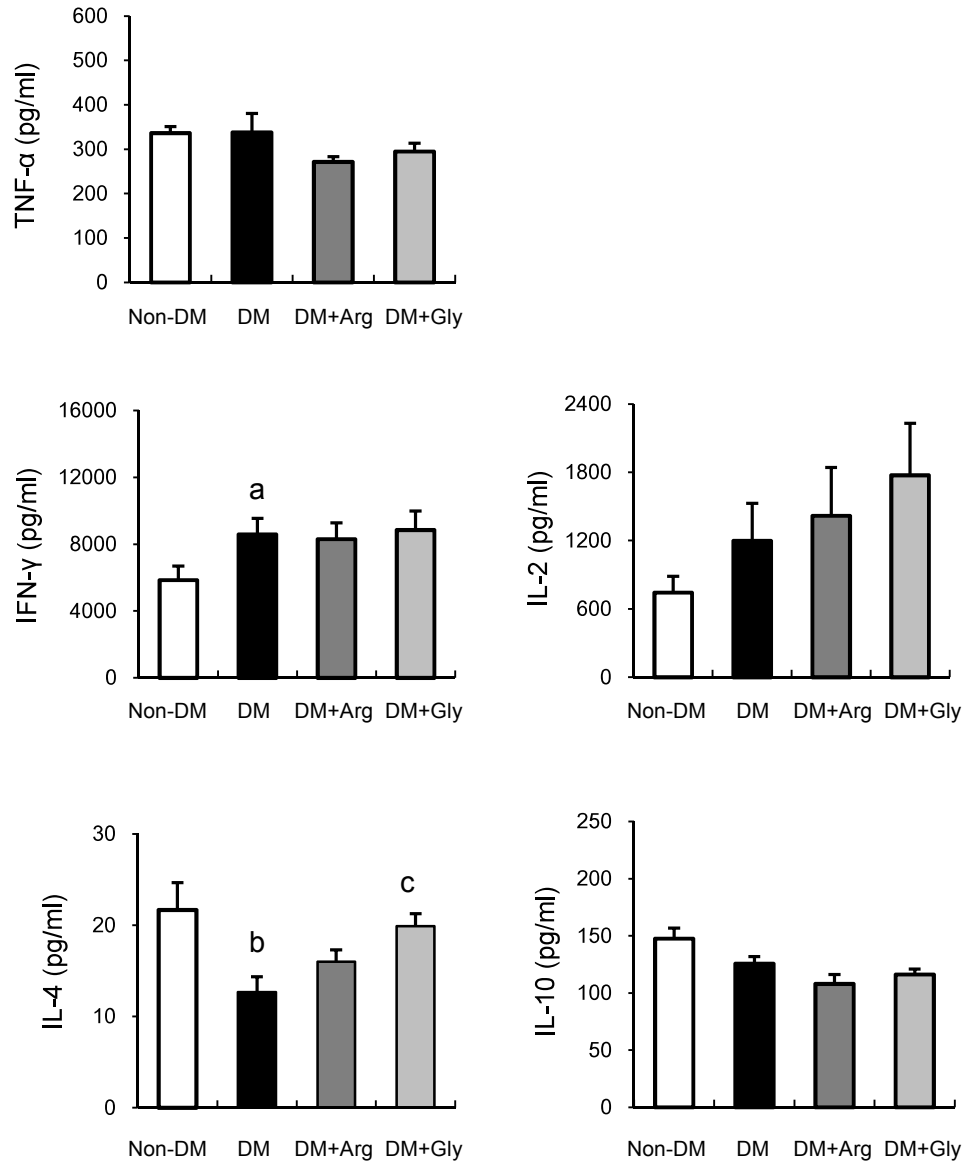


Figure 4-2. Cytokine concentrations in the culture supernatant of mitogen-stimulated splenocytes. Values are expressed as means  $\pm$  SE. <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs. Non-DM; <sup>c</sup>  $P < 0.01$  vs. DM. Animals per group:  $n = 9-10$ . DM, diabetes mellitus; Arg, arginine; Gly, glycine.

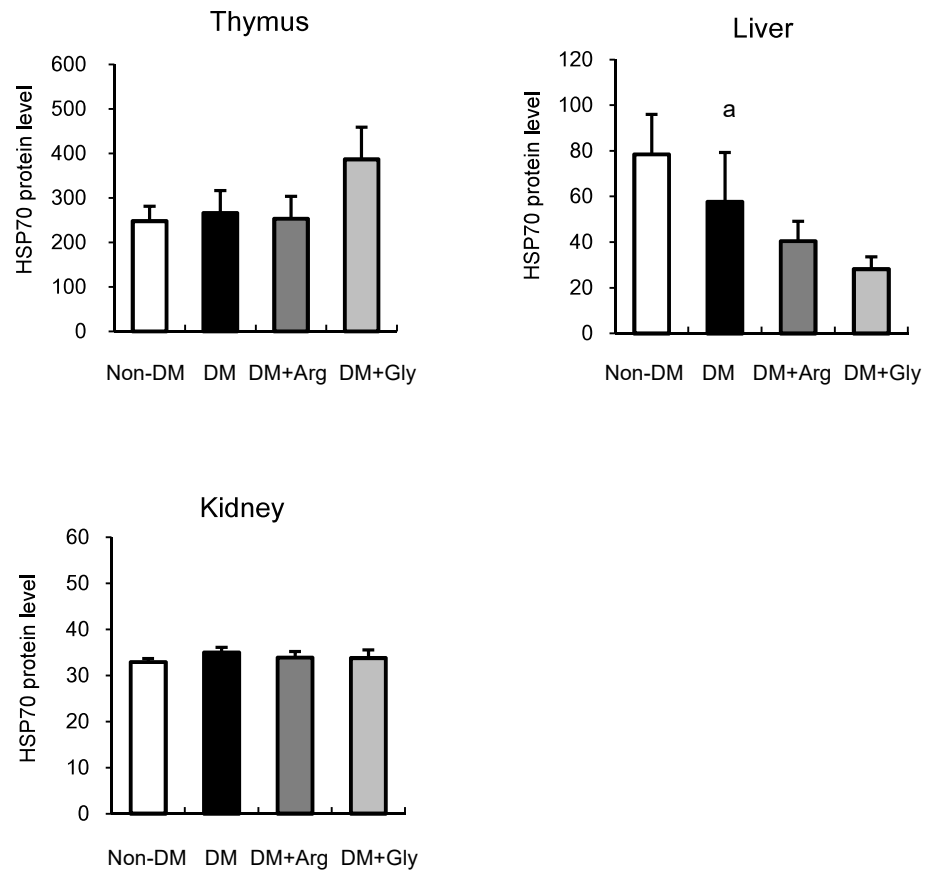


Figure 4-3. HSP70 protein levels. HSP70 protein levels are expressed as HSP70 concentration (ng/ml) / total protein concentration (mg/ml) values in the homogenized supernatant of thymus, liver, and kidney. Values are expressed as means  $\pm$  SE. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs. Non-DM. Animals per group:  $n = 9-10$ . DM, diabetes mellitus; Arg, arginine; Gly, glycine.



## 総括

肥満は2型糖尿病、動脈硬化性疾患、がん等に加え、感染症、ワクチン不全、アレルギー性疾患発症等の免疫機能の変調と関連付けられている。さらに、肥満に関連する病態への脂肪組織における慢性炎症プロセスの関与が示され、肥満を基盤とした種々の病態を検討する上で免疫系変化のメカニズムを解明することが望まれる。本研究では、免疫系への関与が示されている生体因子の一つである熱ショックタンパク質（Heat shock protein ; HSP）ならびに免疫系に作用し得る栄養素に着目し、肥満に関連する病態の免疫系変化について検討を行った。

第1章〔研究1〕においては、肥満における免疫細胞の変化とHSPとの関連について検討するため、肥満モデルマウス由来の胸腺細胞および脾細胞において *in vitro* での熱ショックが胸腺細胞のアポトーシスおよび脾細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響を解析した。胸腺細胞に対して熱ショックを加えた場合にアポトーシス細胞比率の増加を伴った生存細胞比率の低下が認められ、その熱ショックによる生存細胞比率の低下は肥満群の胸腺細胞においてより顕著であったことから、肥満における胸腺細胞アポトーシスの増加が熱ショック応答の変化と関連することが示唆された。また、脾細胞サイトカインの解析では、肥満ならびに熱ショックによってサイトカイン産生が多様に変化することが示された。

第2章〔研究2および3〕においては、肥満の免疫機能およびHSPについて脂肪組織にも注目した解析を行った。サイトカイン産生やタンパク質恒常性等に関与するHSPファミリーの1つであるHSP70について解析した結果、肥満モデルマウス由来の脾細胞におけるHSP70タンパク質レベルの低下、また脂肪組織においてはHSP70タンパク質レベルの低下傾向を認め、肥満において免疫細胞や脂肪組織のHSP70発現が低下することが肥満の病態と関連する可能性が示唆された。さらに、免疫系やHSP70発現に関与するアミノ酸であるグルタミンが及ぼす影響について解析した結果、グルタミンを添加した高脂肪食を摂取したマウスでは、グルタミン添加のない高脂肪食を摂取したマウスに対して脂肪組織HSP70タンパク質レベルが高値であることが示された。さらに、脂肪組織培養実験において、グルタミン低濃度の培養条件下においた場合に肥満モデルマウス由来の脂肪組織では非肥満マウス由来の脂肪組織と比較してHSP70タンパク質レベルが低値であること、グルタミン濃度が高いほど脂肪組織のIL-10産生が高値傾向であることが示された。以上の結果から、グルタミンが脂肪組織のHSP70発現やIL-10産生への影響を介して肥満に関連した病態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

第3章〔研究4〕では、免疫系に作用し得るアミノ酸であるアルギニンおよびグリシンが高脂肪食およびストレプトゾトシン投与により誘導した2型糖尿病型モデルマウスの免疫機能およびHSP70発現に及ぼす影響について検討した。アルギニンおよびグリシン摂取によるHSP70発現への有意な影響は明らかではなかったが、グリシンによるIL-4産生の上昇、すなわちサイトカインバランスへの影響が認められ、免疫機能および炎症の視点から2型糖尿病の病態を調節し得る可能性が示された。

以上3つの章からなる研究により、肥満における免疫変化や炎症に関連する免疫細胞および脂肪組織での熱ショックタンパク質の変化が肥満に関連した病態形成のメカニズムの1つであることを示唆した。また、免疫・炎症の観点から免疫栄養素が肥満に関連した病態においてサイトカインや熱ショックタンパク質に影響することにより病態を調節する可能性が示唆された。これらの知見は、肥満における免疫機能変化や炎症病態のメカニズムの解明、さらに免疫・炎症の視点からの栄養管理および免疫栄養療法開発の基礎研究として位置づけられる。

## Summary

### Analysis of immune function and heat shock protein in obesity

Eka Fujimoto

Obesity has been associated with impaired immune function and chronic low-grade inflammation, leading to various health problems such as type 2 diabetes mellitus, cancer, infections, and allergic diseases. Heat shock proteins (HSPs), which are highly conserved proteins and are essential for surviving against a wide range of stresses, play various roles in immune system including regulation of cytokine production. Previous studies have shown that HSP expression is altered in some organs and tissues in obesity and type 2 diabetes mellitus. On the other hand, modulation of immune functions by various nutrients, such as amino acids and n-3 polyunsaturated fatty acids, and mechanisms of the modulation have increasingly been studied.

In the present studies, we investigated immune functions and HSPs in mouse models of obesity or type 2 diabetes mellitus to explore mechanisms of obesity-related changes in immune system and effects of immune-modulating nutrients on them.

#### Chapter 1: [Study 1]

**Mechanism analysis of alterations in immune system in obesity: from the viewpoint of heat shock response.**

This study investigated the effects of *in vitro* heat shock (HS) on immune cells from the viewpoint of thymocyte apoptosis and T cell mitogen-stimulated splenocyte cytokine production as well as heat shock protein 70 (HSP70) levels in high fat diet-induced obese mice. The *in vitro* HS at 42 °C decreased the rate of live cells in thymocytes, and the degree of the decrease was larger in obese mice compared with non-obese mice. The results suggest an association between the viability of thymocytes and an altered HS response in obesity. The *in vitro* HS prior to T cell

mitogen stimulation affected cytokine production by mitogen-stimulated splenocytes with or without obesity. The effects of obesity on HSP70 protein levels in thymocytes and splenocytes were not obvious; however, these results suggest that the increase in thymocyte apoptosis in obesity could be, in part, due to the alteration of the HS response. In addition, this study suggests that alteration in HSP expression may alter cytokine production.

## **Chapter 2: [Study 2 and 3]**

### **Analysis of adipose tissue and immune cells in obesity: cytokine, heat shock protein, and immune-modulating nutrients.**

We investigated cytokine and HSP70 levels of adipose tissue and immune cells in obesity as well as the effects of glutamine on them in Study 2 and 3. In Study 2, we analyzed HSP70 protein and cytokine levels in mice fed a standard diet (SD), high-fat diet (HFD), or high-fat diet supplemented with glutamine (HFD-Gln). HFD-induced obese mice presented lower HSP70 levels in splenocytes and a tendency towards lower HSP70 levels in epididymal adipose tissues than non-obese mice. Interleukin (IL)-10 levels of adipose tissues and splenocytes tended to be lower in obese mice than in non-obese mice. HFD-Gln group presented higher HSP70 levels in adipose tissues than HFD group. In Study 3, we examined cytokine and HSP70 levels of epididymal adipose tissues from obese mice and non-obese mice which were cultured in medium with 0.5 mM or 2 mM glutamine. The higher concentration of glutamine tended to increase IL-10 levels of adipose tissues. HSP70 levels of adipose tissues cultured in medium with the lower glutamine were lower in obese mice than non-obese mice. These studies revealed lowered HSP70 levels of adipose tissue and immune cells in obesity and suggest that glutamine affects obesity-related conditions through changes in cytokine and HSP70 levels.

## **Chapter 3: [Study 4]**

### **Effects of immune-modulating nutrients on immune function and heat shock protein in type 2 diabetes mellitus.**

We investigated effects of arginine or glycine on immune function and HSP70 levels in mouse model of type 2 diabetes mellitus (DM) induced by high-fat diet and streptozotocin. The DM model mice presented higher interferon- $\gamma$  and lower IL-4 levels of T cell mitogen-stimulated splenocytes as well as lower HSP70 levels in liver compared with non-DM mice. Glycine supplementation increased IL-4 levels in the DM model mice, while arginine supplementation did not present significant effects. These results suggest that amino acids which can affect immune function modulate the pathology of type 2 diabetes mellitus through effects on immune function and inflammation.

The present studies showed that (1) heat shock response in immune cells is affected by obesity, leading to alteration in immune systems, (2) cytokine and HSP70 levels in adipose tissue and immune cells are altered in obesity, (3) glutamine influences cytokine and HSP70 levels in adipose tissues, (4) immune-modulating amino acids regulate cytokine production in type 2 diabetes mellitus.

## 参考文献

- 1) World Health Organization. Obesity and overweight. 2018; Available at: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed Oct 13, 2018.
- 2) 厚生労働省. 平成 29 年国民健康・栄養調査.
- 3) Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol* 2012;13(8):707-712.
- 4) Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Adv Nutr* 2016;7(1):66-75.
- 5) Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631-677.
- 6) Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381(6583):571-580.
- 7) 伊藤英晃. 哺乳類分子シャペロンの作用機構. *生化学* 2005;77(9):1137-1151.
- 8) Muralidharan S, Mandrekar P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol* 2013;94(6):1167-1184.
- 9) 林雄一郎, 上口権二郎, 鳥越俊彦. 分子シャペロン. *病理と臨床* 2004;vol.22 臨時増刊号:69-74.
- 10) Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MHS, Mesa JL, et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(5):1739-1744.
- 11) Kurucz I, Morva Á, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 2002;51(4):1102-1109.
- 12) Kavanagh K, Zhang L, Wagner JD. Tissue-specific regulation and expression of heat shock proteins in type 2 diabetic monkeys. *Cell Stress Chaperones* 2009;14(3):291-299.
- 13) Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 2009;58(3):567-578.

- 14) Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 1998;16(9): 833-838.
- 15) Newsholme P, de Bittencourt PI, Jr. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014;17(4):295-305.
- 16) Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010;2(3): 238-247.
- 17) Monk JM, Hou TY, Chapkin RS. Recent advances in the field of nutritional immunology. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7(6):747-749.
- 18) 深柄和彦. Immunonutrients の作用機序. 静脈経腸栄養 2007;22(3):277-281.
- 19) Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. *Br J Nutr* 2007; 98 Suppl 1:S133-9.
- 20) Connaughton RM, McMorrow AM, McGillicuddy FC, Lithander FE, Roche HM. Impact of anti-inflammatory nutrients on obesity-associated metabolic-inflammation from childhood through to adulthood. *Proc Nutr Soc* 2016; 75(2):115-124.
- 21) Fujimoto E, Imai A, Utsuyama M, Sato K. Effects of in vitro heat shock on immune cells in diet-induced obese mice. *J Therm Biol* 2017;69:124-131.
- 22) 藤本絵香, 今井敦子, 佐藤和人. L-グルタミンが肥満マウスの脂肪組織に及ぼす影響 : サイトカインおよび熱ショックタンパク質の解析. 日本女子大学大学院紀要 家政学研究科・人間生活学研究科 2015;21:9-15.
- 23) 藤本絵香, 板橋彩子, 佐伯摩里枝, 蕪木智子, 佐藤和人. 免疫栄養素としてのアミノ酸が2型糖尿病モデルの病態に及ぼす影響: 免疫機能および熱ショックタンパク質からの解析. 機能性食品と薬理栄養 2012;7(2):165-174.
- 24) Yoshida K, Nakashima E, Kubo Y, Yamaoka M, Kajimura J, Kyoizumi S, et al. Inverse associations between obesity indicators and thymic T-cell production levels in aging atomic-bomb survivors. *PLoS One* 2014;9(3):e91985.
- 25) Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, et al. Obesity accelerates thymic aging. *Blood* 2009;114(18):3803-3812.
- 26) Ip BC, Hogan AE, Nikolajczyk BS. Lymphocyte roles in metabolic dysfunction: of

- men and mice. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26(2):91-100.
- 27) Palmer DB. The effect of age on thymic function. *Front Immunol* 2013;4:316.
- 28) Singh IS, Hasday JD. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia* 2013;29(5):423-435.
- 29) Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes* 2003;52(9):2338-2345.
- 30) Kappel M, Diamant M, Hansen MB, Klokke M, Pedersen BK. Effects of in vitro hyperthermia on the proliferative response of blood mononuclear cell subsets, and detection of interleukins 1 and 6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology* 1991;73(3):304-308.
- 31) Hooper PL, Hooper PL. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. *Cell Stress and Chaperones* 2009;14(2):113-115.
- 32) Stocki P, Wang XN, Dickinson AM. Inducible heat shock protein 70 reduces T cell responses and stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells. *J Biol Chem* 2012;287(15):12387-12394.
- 33) Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004;81(2):243-248.
- 34) de Fries R, Mitsushashi M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal* 1995;9(2):89-95.
- 35) 矢田純一. 医系免疫学. 改定 13 版 (中外医学社) 2013.
- 36) Sellins KS, Cohen JJ. Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. *Radiat Res* 1991;126(1):88-95.
- 37) Belay HT, Brown IR. Spatial analysis of cell death and Hsp70 induction in brain, thymus, and bone marrow of the hyperthermic rat. *Cell Stress Chaperones* 2003;8(4):395-404.
- 38) Viardot A, Heilbronn LK, Samocha-Bonet D, Mackay F, Campbell LV, Samaras K. Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes*



- Metab Res Rev 2012;28(5):447-454.
- 39) Noble EG, Shen GX. Impact of exercise and metabolic disorders on heat shock proteins and vascular inflammation. *Autoimmune Dis* 2012;2012:836519.
  - 40) Tiss A, Khadir A, Abubaker J, Abu-Farha M, Al-Khairi I, Cherian P, et al. Immunohistochemical profiling of the heat shock response in obese non-diabetic subjects revealed impaired expression of heat shock proteins in the adipose tissue. *Lipids Health Dis* 2014;13:106-511X-13-106.
  - 41) Duan MC, Zhong XN, Liu GN, Wei JR. The Treg/Th17 Paradigm in Lung Cancer. *J Immunol Res* 2014;2014:730380.
  - 42) Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* 2010;7(3):182-189.
  - 43) van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 2012; 61(2):401-408.
  - 44) Mito N, Hosoda T, Kato C, Sato K. Change of cytokine balance in diet-induced obese mice. *Metabolism* 2000;49(10):1295-1300.
  - 45) Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, Winer D, et al. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 2009;39(9):2629-2635.
  - 46) Huang YH, Haegerstrand A, Frostegard J. Effects of in vitro hyperthermia on proliferative responses and lymphocyte activity. *Clin Exp Immunol* 1996;103(1): 61-66.
  - 47) Downing JF, Martinez-Valdez H, Elizondo RS, Walker EB, Taylor MW. Hyperthermia in humans enhances interferon-gamma synthesis and alters the peripheral lymphocyte population. *J Interferon Res* 1988;8(2):143-150.
  - 48) Bouchama A, Hammami MM, Al Shail E, De Vol E. Differential effects of in vitro and in vivo hyperthermia on the production of interleukin-10. *Intensive Care Med* 2000;26(11):1646-1651.
  - 49) Han JM, Levings MK. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. *J Immunol* 2013;191(2):527-532.

- 50) Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:71.
- 51) Diaz-Ruiz A, Guzman-Ruiz R, Moreno NR, Garcia-Rios A, Delgado-Casado N, Membrives A, et al. Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal* 2015;23(7):597-612.
- 52) Di Naso FC, Porto RR, Fillmann HS, Maggioni L, Padoin AV, Ramos RJ, et al. Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring)* 2015;23(1):120-129.
- 53) 橋口陽二郎, 望月英隆. 栄養とサイトカイン. *医学のあゆみ* 2003;206(6/7):463-466.
- 54) Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, et al. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* 2005;204(2):392-401.
- 55) Wischmeyer PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* 2002; 18(3):225-228.
- 56) Hamiel CR, Pinto S, Hau A, Wischmeyer PE. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297(6):C1509-19.
- 57) Xue H, Slavov D, Wischmeyer PE. Glutamine-mediated dual regulation of heat shock transcription factor-1 activation and expression. *J Biol Chem* 2012; 287(48): 40400-40413.
- 58) Xi P, Jiang Z, Zheng C, Lin Y, Wu G. Regulation of protein metabolism by glutamine: implications for nutrition and health. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; 16:578-597.
- 59) Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* 1990;48(8):297-309.
- 60) Takashina C, Tsujino I, Watanabe T, Sakaue S, Ikeda D, Yamada A, et al. Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance. *Nutr Metab (Lond)* 2016;13: 5-015-0059-5. eCollection 2016.
- 61) Menge BA, Schrader H, Ritter PR, Ellrichmann M, Uhl W, Schmidt WE, et al. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type

- 2 diabetes. *Regul Pept* 2010;160(1-3):75-80.
- 62) Henstridge DC, Whitham M, Febbraio MA. Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes. *Mol Metab* 2014;3(8):781-793.
- 63) Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *J Nutr* 1999;129(8):1524-1531.
- 64) Wells SM, Kew S, Yaqoob P, Wallace FA, Calder PC. Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. *Nutrition* 1999;15(11-12):881-884.
- 65) Zuhl M, Dokladny K, Mermier C, Schneider S, Salgado R, Moseley P. The effects of acute oral glutamine supplementation on exercise-induced gastrointestinal permeability and heat shock protein expression in peripheral blood mononuclear cells. *Cell Stress Chaperones* 2015;20(1):85-93.
- 66) Opara EC, Petro A, Tevrizian A, Feinglos MN, Surwit RS. L-glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in C57BL/6J mice. *J Nutr* 1996;126(1):273-279.
- 67) Cohen S, Danzaki K, MacIver NJ. Nutritional effects on T-cell immunometabolism. *Eur J Immunol* 2017;47(2):225-235.
- 68) Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc Res* 2017;113(9):1009-1023.
- 69) Jung UJ, Seo YR, Ryu R, Choi MS. Differences in metabolic biomarkers in the blood and gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells among normal weight, mildly obese and moderately obese subjects. *Br J Nutr* 2016;116(6):1022-1032.
- 70) Kohlgruber A, Lynch L. Adipose tissue inflammation in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2015;15(11):92-015-0670-x.
- 71) Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(8):a004374.
- 72) Yeh SL, Lai YN, Shang HF, Lin MT, Chen WJ. Effects of glutamine supplementation on innate immune response in rats with gut-derived sepsis. *Br J Nutr* 2004;91(3):423-429.

- 73) Yeh SL, Lai YN, Shang HF, Lin MT, Chiu WC, Chen WJ. Effects of glutamine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with septic peritonitis. *World J Gastroenterol* 2005;11(12):1742-1746.
- 74) Laviano A, Molino A, Lacaria MT, Canelli A, De Leo S, Preziosa I, et al. Glutamine supplementation favors weight loss in nondieting obese female patients. A pilot study. *Eur J Clin Nutr* 2014;68(11):1264-1266.
- 75) Mansour A, Mohajeri-Tehrani MR, Qorbani M, Heshmat R, Larijani B, Hosseini S. Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Nutrition* 2015;31(1):119-126.
- 76) Elia M. Glutamine metabolism in human adipose tissue in vivo. *Clin Nutr* 1993; 12(1):51-53.
- 77) Sikalidis AK. Amino acids and immune response: a role for cysteine, glutamine, phenylalanine, tryptophan and arginine in T-cell function and cancer? *Pathol Oncol Res* 2015;21(1):9-17.
- 78) Claria J, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Rius B, Titos E. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. *Front Immunol* 2011;2:49.
- 79) Lin Z, Cai F, Lin N, Ye J, Zheng Q, Ding G. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor-kappaB expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med* 2014;7(2):365-370.
- 80) Sellmann C, Jin CJ, Degen C, De Bandt JP, Bergheim I. Oral Glutamine Supplementation Protects Female Mice from Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Nutr* 2015;145(10):2280-2286.
- 81) Oehler R, Pusch E, Dangel P, Zellner M, Eliassen MM, Brabec M, et al. Glutamine depletion impairs cellular stress response in human leucocytes. *Br J Nutr* 2002;87 Suppl 1:S17-21.
- 82) Yaqoob P, Calder PC. Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. *Cytokine* 1998; 10(10):790-794.
- 83) Chang WK, Yang KD, Shiao MF. Effect of glutamine on Th1 and Th2 cytokine

- responses of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol* 1999; 93(3): 294-301.
- 84) 真鍋一郎. メタボリックシンドローム. 医学のあゆみ 2010;234(5):523-526.
- 85) Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117(1):175-184.
- 86) Baranowski M, Enns J, Blewett H, Yakandawala U, Zahradka P, Taylor CG. Dietary flaxseed oil reduces adipocyte size, adipose monocyte chemoattractant protein-1 levels and T-cell infiltration in obese, insulin-resistant rats. *Cytokine* 2012;59(2):382-391.
- 87) Han JM, Patterson SJ, Speck M, Ehses JA, Levings MK. Insulin inhibits IL-10-mediated regulatory T cell function: implications for obesity. *J Immunol* 2014; 192(2):623-629.
- 88) Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD, Ren H, Musch MW, Kahana M, et al. Glutamine attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$  release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 2003;19(1): 1-6.
- 89) Powell-Tuck J. Nutritional interventions in critical illness. *Proc Nutr Soc* 2007; 66(1):16-24.
- 90) Bernabucci U, Basirico L, Morera P, Lacetera N, Ronchi B, Nardone A. Heat shock modulates adipokines expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Mol Endocrinol* 2009; 42(2):139-147.
- 91) 清野裕, 南條輝志男, 田嶋尚子, 門脇孝, 柏木厚典, 荒木栄一, 他. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告 (国際標準化対応版). *糖尿病* 2012;55(7):485-504.
- 92) 五十嵐智雄, 羽入修, 曾根博仁. 糖尿病大血管症の成因・疫学. *糖尿病学* (西村書店) 2015:435-451.
- 93) 平田健一. 動脈硬化と慢性炎症—血管内皮細胞—. 慢性炎症と生活習慣病 (南山堂) 2013:75-80.
- 94) Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab* 2012;15(4):518-533.
- 95) 根本憲一, 前川聡. 感染症. *糖尿病学* (西村書店) 2015:552-556.
- 96) Li P, Yin YL, Li D, Kim WS, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr*

2007;98(2):237-252.

- 97) Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH.  
Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995;95(4): 1446-1456.
- 98) Luo J, Quan J, Tsai J, Hobensack CK, Sullivan C, Hector R, et al. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998;47(6): 663-668.
- 99) Chang FY, Shaio MF. Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1995;28(2): 137-146.
- 100) Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(3):813-823.
- 101) Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, Rehman Q, Hasturk H, Apovian CM, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol* 2011;186(2):1162-1172.
- 102) 小林光男, 今村稔, 大野恭裕, 鈴木有朋. 2型糖尿病患者における血しょう NO(nitric oxide)レベルの検討. *近畿大学医学雑誌* 2001;26(4):337-344.
- 103) 田中芳明, 溝手博義. 栄養と免疫系の制御 臨床における Immunonutrition の展開. *臨床栄養* 2003;102(5):573-580.
- 104) Kohli R, Meininger CJ, Haynes TE, Yan W, Self JT, Wu G. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 2004;134(3):600-608.
- 105) Liu CT, Chen KM, Lee SH, Tsai LJ. Effect of supplemental L-arginine on the function of T lymphocytes and the formation of advanced glycosylated end products in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nutrition* 2005;21(5):615-623.
- 106) Cherla G, Jaimes EA. Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. *J Nutr* 2004;134(10 Suppl):2801S-2806S; discussion 2818S-2819S.
- 107) Lucotti P, Setola E, Monti LD, Galluccio E, Costa S, Sandoli EP, et al. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and

- exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(5):E906-12.
- 108) Wheeler MD, Thurman RG. Production of superoxide and TNF- $\alpha$  from alveolar macrophages is blunted by glycine. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 1):L952-9.
- 109) Ikejima K, Iimuro Y, Forman DT, Thurman RG. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 1):G97-103.
- 110) Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117(4):1162-1172.
- 111) Cruz M, Maldonado-Bernal C, Mondragon-Gonzalez R, Sanchez-Barrera R, Wachter NH, Carvajal-Sandoval G, et al. Glycine treatment decreases proinflammatory cytokines and increases interferon- $\gamma$  in patients with type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 2008;31(8):694-699.
- 112) Adachi H, Kondo T, Ogawa R, Sasaki K, Morino-Koga S, Sakakida M, et al. An acyclic polyisoprenoid derivative, geranylgeranylacetone protects against visceral adiposity and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299(5):E764-71.

## 謝辞

本研究を遂行し、本論文をまとめるにあたり、終始多大なる御指導ならびに御高閲をいただきました日本女子大学教授 佐藤和人先生に心より感謝申し上げます。本論文を御高閲いただきました日本女子大学教授 五関正江先生、日本女子大学准教授 太田正人先生、ならびに東京医科歯科大学大学院教授 江石義信先生に深謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり御指導いただきました日本女子大学特任准教授 東田寿子先生、ならびに宇津山正典先生、石本強先生、大東文化大学 蕪木智子先生、横浜国立大学 三戸夏子先生、山梨学院大学 吉野美香先生に深く御礼申し上げます。

多くの御助言と御協力をいただきました日本女子大学助教 今井敦子先生をはじめとする日本女子大学家政学部食物学科臨床栄養学・免疫病理学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。