

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15399

研究課題名(和文) 腸管NAMPT-NAD合成系を標的としたNMNによるインスリン抵抗性予防法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic potential of intestinal epithelial NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis in insulin resistance

研究代表者

山口 慎太郎 (Yamaguchi, Shintaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50464855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管NAMPT-NAD⁺合成系の糖代謝制御における役割を検証するために、腸管上皮細胞特異的Namp1ノックアウトマウスを作成・解析し、腸管のNAMPT-NAD⁺合成系の障害が、GLP-1分泌不全、インスリン初期分泌不全および食後高血糖を惹起することを見出した。

さらに、高脂肪食誘導性肥満マウスへのNMN経口投与による腸管NAD⁺量の回復・上昇は、内因性GLP-1分泌を促進し、食後高血糖を改善することを見出した。

本研究で得られた知見は、NMNによる腸管NAMPT-NAD⁺合成系を標的とした介入が、GLP-1分泌を促進し、食後高血糖の治療法開発に繋がる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の検討により、腸管NAMPT-NAD⁺合成系の障害が、GLP-1分泌不全、インスリン初期分泌不全及び食後高血糖の原因の一端であることが示された。さらに、NMNによる腸管NAD⁺量の回復が、内因性GLP-1分泌を促進することより、食後高血糖への新たな治療法開発に繋がる可能性が示唆された。

Funagata試験では、食後高血糖が心血管疾患発症の重大なリスクファクターであることが示されており、腸管NAMPT-NAD⁺合成系を標的としたNMN経口投与による腸管NAD⁺量の回復は、新たな心血管疾患発症の予防法開発につながる可能性が高い。今後トランスレーショナルリサーチを積極的に展開していきたい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present project was to test the hypothesis that intestinal NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis plays a critical role in obesity-associated insulin resistance. To this end, we generated and analyzed intestinal epithelial cells-specific Namp1 knockout mouse model, namely INKO mice.

We found that INKO mice did not exhibit insulin resistance. However, INKO had decreased production of glucagon-like peptide-1 (GLP-1), resulting in reduced early-phase insulin secretion and postprandial hyperglycemia. Importantly, nicotinamide mononucleotide (NMN), a product of NAMPT reaction, restored intestinal NAD⁺ levels and increased GLP-1 production in high fat diet-induced obese mice. Taken together, our results demonstrate that intestinal NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis is essential for a normal glucoregulatory response via regulating GLP-1 production.

This work provides therapeutic insights into intestinal NAD⁺ biology in the obesity-associated dysregulation of glucose metabolism.

研究分野：NAD合成系

キーワード：NAD合成系 腸管 インクレチン 食後高血糖 肥満

1. 研究開始当初の背景

哺乳類ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(nicotinamide adenine dinucleotide: NAD⁺)合成系の鍵酵素であるニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(nicotinamide phosphoribosyltransferase: NAMPT)は環境・栄養状態に応答することでNAD⁺量を調節し、サーチュインに代表されるNAD⁺消費酵素を介して代謝疾患などにおいて重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。さらに、インスリン抵抗性、2型糖尿病などにおいてNAMPTの酵素反応産物であるニコチンアミドモノヌクレオチド(nicotinamide mononucleotide: NMN)や、ニコチンアミドリボシド(nicotinamide riboside: NR)などのNAD⁺中間代謝産物がNAD⁺量を増加させ、病態を改善することも報告されている(図1)。実際に、研究代表者らはこれまでに、汎脂肪細胞および褐色脂肪細胞特異的 *Nampt* ノックアウトマウスを作成し、脂肪組織のNAMPT-NAD⁺合成系がインスリン抵抗性やエネルギー代謝を制御することを報告してきた(Stromsdorfer¹, Yamaguchi² et al. *Cell Rep.* 2016)(Yamaguchi et al. *Bioessays.* 2017)(Yamaguchi et al. *PNAS.* 2019)。

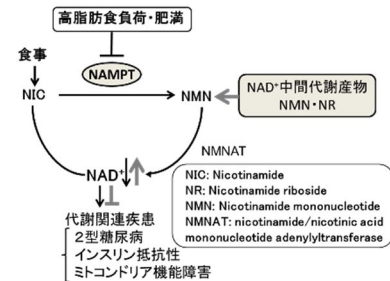


図1 哺乳類NAD⁺合成系および代謝疾患制御 (生化学 第87巻2号 239-244, 2015 山口ら, 改)

さらに近年、高脂肪食負荷により生じる腸管の炎症及び腸管バリア機能の低下が、脂肪組織の炎症およびそれに伴う全身のインスリン抵抗性の発症に先行することが報告された(*Cell Metab.* 2016)。

これらの知見より、高脂肪食負荷下において、腸管の炎症を介したインスリン抵抗性発症の制御因子として、腸管 NAMPT-NAD⁺合成系に注目した。

そこで、本研究では、高脂肪食負荷による(1) 腸管の炎症を介したインスリン抵抗性発症における腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の役割の検討、(2) 腸管 NAMPT-NAD⁺合成系を標的とした新規のインスリン抵抗性発症予防法開発、に向けて研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、高脂肪食負荷による腸管の炎症・バリア機能低下における腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の役割を検討すること、さらには腸管 NAMPT-NAD⁺合成系を標的とした腸管炎症の予防を介する、全身のインスリン抵抗性の発症予防法を開発することを研究の目的とした。そこで、(1) 高脂肪食負荷により腸管 NAMPT-NAD⁺合成系が障害されるか、(2) 腸管上皮細胞特異的 *Nampt* ノックアウト(Intestinal epithelial cells-specific *Nampt* knockout: INKO)マウスを用いた、腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の腸管の炎症・バリア機能保持および全身のインスリン抵抗性発症制御における役割、(3) NAD⁺中間代謝産物 NMN の経口投与による腸管 NAD⁺量の回復が腸管の炎症を抑制し、インスリン抵抗性発症を予防できるか、を検討する方針とした(図2)。

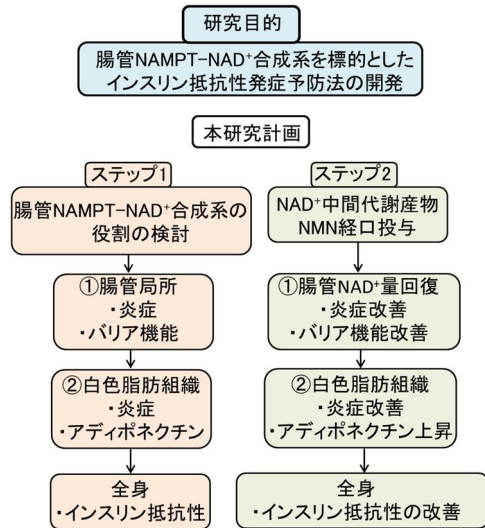


図2 本実験の研究目的・計画

3. 研究の方法

本研究では、(1)高脂肪食負荷により、腸管 NAMPT-NAD⁺合成系が脂肪組織 NAMPT-NAD⁺合成系、全身のインスリン抵抗性発症に先行して障害されるか、(2) INKO マウスを用いた、腸管の炎症及びインスリン抵抗性発症制御における腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の役割、(3)腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の障害によるインスリン抵抗性発症機序の解明、(4)NMN による腸管 NAD⁺量の回復が、腸管炎症の抑制を介したインスリン抵抗性の新規発症予防法になり得るか、を検証するべく、研究開始当初は以下のような研究方法を立案した。

高脂肪食負荷マウスにおける腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の測定

高脂肪食(High fat diet: HFD)負荷によりインスリン抵抗性が発症するまでの過程における腸管・脂肪組織 NAMPT-NAD⁺合成系を経時的に評価する。これらにより、高脂肪食負荷によって、まずは腸管 NAMPT-NAD⁺合成系が障害され、その後脂肪組織 NAMPT-NAD⁺合成系が障害され、インスリン抵抗性が発症するかを明らかとする。

INKO マウスの作成および表現型の解析

腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の腸管炎症・腸管バリア機能、さらに全身性のインスリン抵抗性発症制御における役割を直接的に検討するため、INKO マウスを、*Nampt*-floxed マウスと、腸管上皮細胞で Cre を発現する *Villin-Cre* (*Vil*-Cre)マウスを用いて作成する。作成した INKO マウスを用いて、インスリン抵抗性、糖代謝、エネルギー代謝を評価する。

INKO マウスへの NMN 経口投与

INKO マウスに離乳直後より NMN の飲水経口投与を行い、腸管 NAD⁺量が回復することで、インス

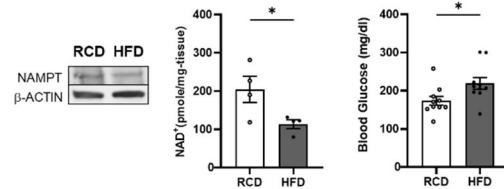
リン抵抗性、糖代謝障害、エネルギー代謝障害が改善するかを検討する。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷と腸管 NAMPT-NAD⁺合成系

C57BL/6J 雄マウスに HFD を 8 週間負荷したところ、通常食群 (Regular chow diet: RCD) と比較して腸管における NAMPT 発現量、NAD⁺量が有意に低下した。また、脂肪組織 *Adiponectin* 発現量に有意な差は認めなかったが、随時血糖は上昇した (Figure. 1)。これらの結果は、高脂肪食投与に伴う初期の糖代謝障害には腸管での NAMPT-NAD⁺合成系の低下に伴う腸管局所の変化が寄与している可能性を示唆していると考えられた。

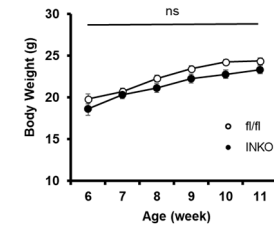
Figure 1



(2) 腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の糖代謝制御における役割の検討

腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の糖代謝制御における意義を検討するために、INKO マウスを作成した。INKO マウスは、通常食投与下ではコントロール flox/flox (fl/fl) マウスと比較して体重には差を認めなかった (Figure. 2)。

Figure 2



続いて、通常食投与下の 2-3 か月齢 INKO マウスの、インスリン抵抗性および糖代謝能を評価した。腹腔内インスリン投与試験 (ITTs) では、INKO マウスおよび fl/fl マウス間でインスリンに対する血糖低下に有意な差は認めなかった。さらに、腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTTs) での血糖値の変化においても 2 群間で有意な差は認めなかった。経口ブドウ糖負荷試験 (OGTTs) では、INKO マウスで有意な血糖値の上昇を呈した。これらの結果は、INKO マウスでの高血糖にはインクレチンの分泌障害が関与する可能性を示唆すると考えた。そこで、グルコース濃度依存的に膵細胞からのインスリン分泌を促す、インクレチン Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の濃度測定および回腸の *Proglucagon* 発現を評価したところ、INKO マウスでいずれも有意に低値であった。さらに、インスリン濃度も GLP-1 と同様に INKO マウスで低値であった (Figure. 3)。

また、NAD⁺中間代謝産物 NMN を INKO マウスに投与すると、小腸での NAD⁺量は回復し、*Proglucagon* 発現および食後高血糖は改善した (Figure. 4)。

これらの結果より、腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の障害に伴う GLP-1 の分泌量低下により INKO マウスではインスリン初期分泌不全をきたし、食後高血糖を呈する事が示された。

Figure 3

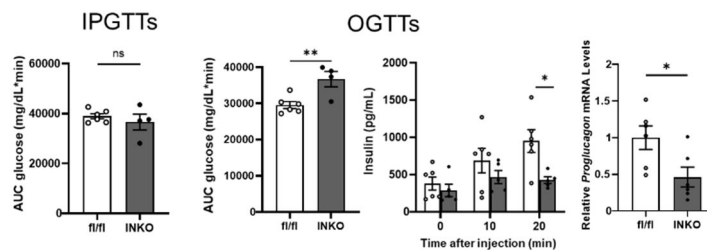
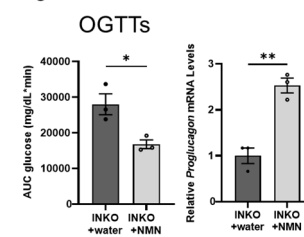


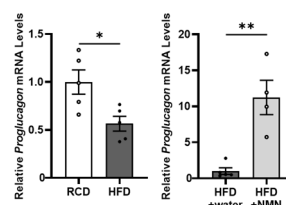
Figure 4



(3) NMN を用いた肥満マウスのインスリン初期分泌不全への介入

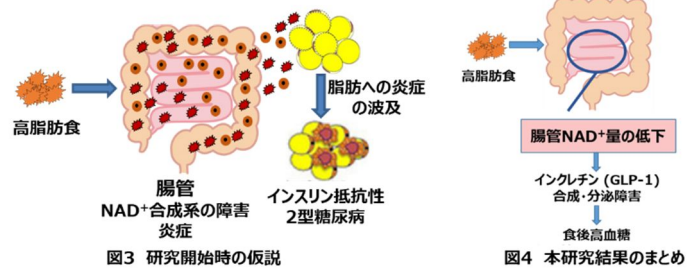
HFD 負荷肥満マウスでは、腸管の NAMPT-NAD⁺合成系が障害されており、さらに RCD 群と比較して回腸での *Proglucagon* 発現の低下および食後高血糖を呈することを見出した。そこで、HFD 負荷肥満マウスに NMN を数週間経口投与したところ、*Proglucagon* 発現が回復し、GLP-1 分泌が改善することが示された (Figure 5)。

Figure 5

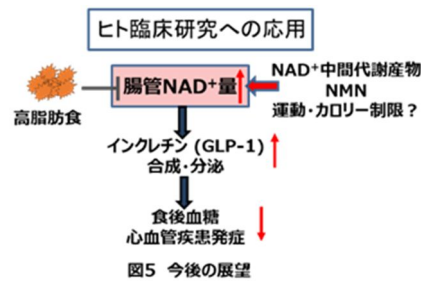


(4) 考察

研究開始当初は、高脂肪食による腸管 NAMPT-NAD⁺合成系の障害が、腸管の炎症を惹起し、脂肪組織の炎症を誘導することでインスリン抵抗性を引き起こす、と仮説を立てた (図 3)。しかし、本研究結果からは、高脂肪食による腸管の NAMPT-NAD⁺合成系の障害は、GLP-1 分泌低下に伴うインスリン初期分泌不全および食後高血糖の原因の一因である可能性が示された。さらに、NMN による腸管 NAD⁺量の回復が、内因性 GLP-1 分泌を促進し、食後高血糖への新たな治療法開発に繋がること示唆された (図 4)。



今後は、小腸 NAD⁺量が GLP-1 分泌を調節する機序の解明を行い、最終的には、腸管 NAD⁺合成系を標的とした食後高血糖改善を目指したトランスレーショナルリサーチを展開していきたい (図 5)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Franczyk Michael P, Qi Nathan, Stromsdorfer Kelly L, Li Chengcheng, Yamaguchi Shintaro, Itoh Hiroshi, Yoshino Mihoko, Sasaki Yo, Brookheart Rita T, Finck Brian N, DeBosch Brian J, Klein Samuel, Yoshino Jun	4. 巻 162
2. 論文標題 Importance of Adipose Tissue NAD+ Biology in Regulating Metabolic Flexibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqab006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 山口慎太郎、伊藤裕、吉野純	4. 巻 57
2. 論文標題 超高齢社会日本におけるNAD+生物学トランスレショナル研究の意義と可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本老年医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 213 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3143/geriatrics.57.213	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamaguchi Shintaro, Franczyk Michael P., Chondronikola Maria, Qi Nathan, Gunawardana Subhadra C., Stromsdorfer Kelly L., Porter Lane C., Wozniak David F., Sasaki Yo, Rensing Nicholas, Wong Michael, Piston David W., Klein Samuel, Yoshino Jun	4. 巻 116
2. 論文標題 Adipose tissue NAD+ biosynthesis is required for regulating adaptive thermogenesis and whole-body energy homeostasis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 23822 ~ 23828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1909917116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Irie Junichiro, Inagaki Emi, Fujita Masataka, Nakaya Hideaki, Mitsuishi Masanori, Yamaguchi Shintaro, Yamashita Kazuya, Shigaki Shuhei, Ono Takashi, Yukioka Hideo, Okano Hideyuki, Nabeshima Yo-ichi, Imai Shin-ichiro, Yasui Masato, Tsubota Kazuo, Itoh Hiroshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Effect of oral administration of nicotinamide mononucleotide on clinical parameters and nicotinamide metabolite levels in healthy Japanese men	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 153 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0313	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiratsuka Ken, Monkawa Toshiaki, Akiyama Tomohiko, Nakatake Yuhki, Oda Mayumi, Goparaju Sravan Kumar, Kimura Hiromi, Chikazawa-Nohtomi Nana, Sato Saeko, Ishiguro Keiichiro, Yamaguchi Shintaro, Suzuki Sayuri, Morizane Ryuji, Ko Shigeru B. H., Itoh Hiroshi, Ko Minoru S. H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Induction of human pluripotent stem cells into kidney tissues by synthetic mRNAs encoding transcription factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37485-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Logan Ryan W., Parekh Puja K., Kaplan Gabrielle N., Becker-Krail Darius D., Williams Wilbur P., Yamaguchi Shintaro, Yoshino Jun, Shelton Micah A., Zhu Xiyu, Zhang Hui, Waplinger Spencer, Fitzgerald Ethan, Oliver-Smith Jeffrey, Sundarvelu Poornima, Enwright John F., Huang Yanhua H., McClung Colleen A.	4. 巻 -
2. 論文標題 NAD+ cellular redox and SIRT1 regulate the diurnal rhythms of tyrosine hydroxylase and conditioned cocaine reward	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-018-0061-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lane C. Porter, Michael P. Franczyk, Terri Pietka, Shintaro Yamaguchi, Jonathan B. Lin, Yo Sasaki, Eric Verdin, Rajendra S. Apte, Jun Yoshino	4. 巻 315
2. 論文標題 NAD+-dependent deacetylase SIRT3 in adipocytes is dispensable for maintaining normal adipose tissue mitochondrial function and whole body metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E520-E530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00057.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shintaro Yamaguchi, Anna C Moseley, Paloma Almeda-Valdes, Kelly L Stromsdorfer, Michael P Franczyk, Adewole L Okunade, Bruce W Patterson, Samuel Klein, Jun Yoshino	4. 巻 103
2. 論文標題 Diurnal Variation in PDK4 Expression Is Associated With Plasma Free Fatty Acid Availability in People.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 1068 ~ 1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2017-02230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口慎太郎、永久太一、小杉将太郎、宇都飛鳥、宮下和季、吉野純、入江潤一郎、伊藤裕
2. 発表標題 腸管NAMPT-NAD+合成系はインクレチン合成調節により全身の糖代謝を制御する
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口慎太郎、永久太一、小杉将太郎、宇都飛鳥、宮下和季、吉野純、入江潤一郎、伊藤裕
2. 発表標題 腸管NAMPT-NAD+合成系はインクレチン合成調節により全身の糖代謝を制御する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口慎太郎、吉野純、永久太一、小杉将太郎、三石正憲、入江潤一郎、脇野修、伊藤裕
2. 発表標題 NAD+合成系賦活化に基づく2型糖尿病およびその合併症予防・治療の試み
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会年次学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shintaro Yamaguchi, Taichi Nagahisa, Junichiro Irie and Hiroshi Itoh.
2. 発表標題 The pathophysiological roles of intestinal NAMPT-mediated NAD+ biosynthesis in whole body glucose metabolism.
3. 学会等名 The 10th APRU Population Aging Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

科研費 研究成果トピックス
https://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/37_topics/data/00196-32612-50464855.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------