

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07490

研究課題名(和文) インドールアミン酸素添加酵素2が糖尿病発症に与える影響

研究課題名(英文) Deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 is associated with the development of lifestyle-related diseases.

研究代表者

山本 康子 (Yamamoto, Yasuko)

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：00331869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪の蓄積による慢性炎症が生活習慣病に共通した基盤病態として注目を集めている。本研究は、インドールアミン酸素添加酵素2(IDO2)が慢性炎症を起点とした生活習慣病の発症に与える影響について高脂肪食負荷モデルを用いて検討した。IDO2遺伝子欠損マウスでは、短期高脂肪食負荷で体重、肝重量が野生型マウスと比較して有意に増加した。また血液生化学検査では、耐糖能異常、肝機能低下が認められた。さらに長期高脂肪食負荷では、IDO2遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ肝臓での線維化の亢進が認められた。本検討によりIDO2遺伝子の欠失は、生活習慣病発症のリスク因子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病は、不健全な生活の積み重ねによる内臓脂肪型肥満が原因となり引き起こされる。わが国においても生活習慣の変化による肥満率の増加は生活習慣病の増加につながる深刻な課題である。本検討によりトリプトファン代謝酵素であるIDO2の欠失は、高脂肪食負荷により肝臓への脂肪蓄積およびインシュリン抵抗性を亢進する事が明らかとなった。さらに長期の高脂肪食負荷は、肝臓の線維化の亢進を認めた。IDO2は、生活習慣病の病態形成において重要な因子であることが明らかとなったことは、増加する生活習慣病の病態解明において新たな知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase 2(IDO2), an isoform of IDO1, is a rate-limiting enzyme that catalyzes the initial reaction of the tryptophan kynurenine pathway, a major pathway in the metabolism of tryptophan. In this study, IDO2 knockout mice were fed a high-fat diet to investigate the effects of IDO2 deficiency on the inflammatory response of adipocytes and its involvement in the pathogenesis of lifestyle-related diseases.

In IDO2 knockout mice at 4 weeks after administration of a high-fat diet, significant increases were observed in serum biochemical parameters, namely, fasting blood glucose, cholesterol, and alanine aminotransferase. Furthermore, a blood glucose tolerance test showed increased insulin resistance in IDO2 knockout mice. In the long-term high-fat diet group, increased liver fibrosis was observed in IDO2 knockout mice compared with wild-type mice. Our results suggest that the deficiency of IDO2 might be a risk factor for lifestyle-related diseases.

研究分野：病態生化学

キーワード：トリプトファン代謝酵素 生活習慣病 インシュリン抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は、不健全な生活の積み重ねによる内臓脂肪型肥満が原因となり引き起こされる。肥満の脂肪組織では、脂肪細胞の増殖・肥大化、マクロファージ浸潤の増加、脂肪細胞とマクロファージの相互作用による炎症性変化が、肥満の病態形成、インスリン抵抗性の惹起、ひいては生活習慣病の進展に寄与していると考えられている。わが国においても生活習慣の変化による肥満率の増加は生活習慣病の増加につながる深刻な課題である。

2. 研究の目的

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) は、トリプトファン代謝の主要経路であるトリプトファン-キヌレン経路の初期反応を触媒する律速酵素で、炎症性サイトカインに誘導され、免疫調節因子としての役割を果たすことが知られている(Muller AJ et al. Nat Med. 2005 11:312-319.)。近年、IDO1に加え、IDO2と呼ばれる新しいアイソフォームが同定された。IDO2の生理的機能は未だに不明な点が多いが、免疫系への関与を示唆する報告もなされている。またこれまでに高脂肪食負荷マウスモデルにおいて、肝臓での Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)およびIDO2発現が確認されている。しかしながら、IDO2がどのように病態に関与するかについては詳細な検討はなされていない。

本研究は、IDO2遺伝子欠損マウスに高脂肪食負荷を行い、IDO2欠損が脂肪細胞に及ぼす影響および生活習慣病の病態形成への関与について検討を行った。

3. 研究の方法

14週齢オスの野生型マウス(Wild type, WT, C57BL/6N)およびIDO2遺伝子欠損マウス(IDO2 knockout mouse, IDO2KO, KOMP, CA, USA)に通常食(Normal diet, ND, 固形飼料 MF、オリエンタル酵母工業)または高脂肪食(High fat diet, HFD32, 日本クレア)およびを4週間摂取させた。マウスには実験飼料と水を自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。なお飼育環境は、室温 23 ± 3 、湿度 $50\pm 10\%$ 、12時間の明暗サイクル(9:00~21:00)で飼育した。本実験は藤田医科大学動物実験委員会の承認を得て、定められた「動物実験施設の整備及び管理の方法並びに具体的な実験の実施方法を定めた規程」に沿って実施した。

耐糖能試験は、飼育最終週に12時間の絶食後、20%グルコース溶液を、1g/kg体重となるようにマウスに経口投与し、経時的に尾部より血糖値の測定を小型血糖測定器にて行った。

実験最終日に、マウスを6時間絶食後、各種臓器を採取した。血液は、麻酔下で下大静脈より採取し、肝臓、精巣上体周囲脂肪を摘出し、臓器重量を測定した。遠心分離後に得られた血清および臓器は、 -80 で保存した。

血清中の総コレステロール、ALT、グルコース濃度を自動分析装置(BioMajesty, BM9130, JEOL)にて分析した。また血清インスリン、アディポネクチン、遊離脂肪酸についてはELISA法にて分析した。

肝臓の組織学的解析のために、ホルマリン固定後にパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびSirius red染色を行った。また肝臓における一次代謝能をメタボローム解析(LCMS-8060, 島津製作所)にて検討した。さらに高脂肪食16週間投与を行う長期の影響についても検討を行い、生化学的検査および組織学的解析を行った。

全てのデータは $\text{mean}\pm\text{SD}$ で表記した。2群間の有意差検定には Student-t 検定 (two-tailed) を用い、3群以上の有意差検定には ANOVA 検定を用いた。 $p < 0.05$ にて統計学的有意と判定した。

4. 研究成果

高脂肪食負群(HFD)は通常食群(ND)に比べ、4週後の体重増加および組織重量の増加が認められた。また IDO2 遺伝子欠損マウス高脂肪食群(IDO2KO-HFD)における体重、肝重量、精巣上体周囲脂肪組織量は、野生型マウス高脂肪食群(WT-HFD)比較して有意に増加していた(図1)。肝臓における組織学的変化を確認したところ、

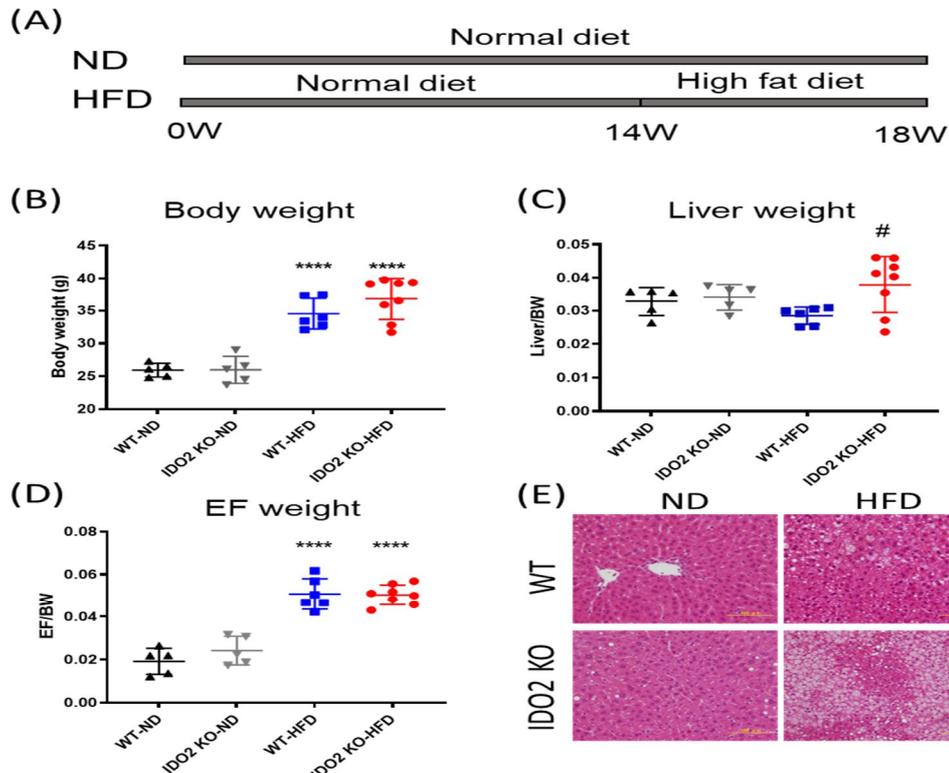


図1 IDO2遺伝子欠損は、高脂肪食負荷による脂肪の蓄積を亢進する。
 (A)高脂肪食負荷スケジュール、(B)体重、(C)肝重量、(D)精巣上体周囲脂肪重量、
 (E)肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色像。
 * p < 0.05, ** p < 0.01 for versus WT-ND mice. WT, wild-type mice; IDO2 KO,
 indoleamine 2,3-dioxygenase 2 knockout mice; ND, Normal diet; HFD, High fat diet.

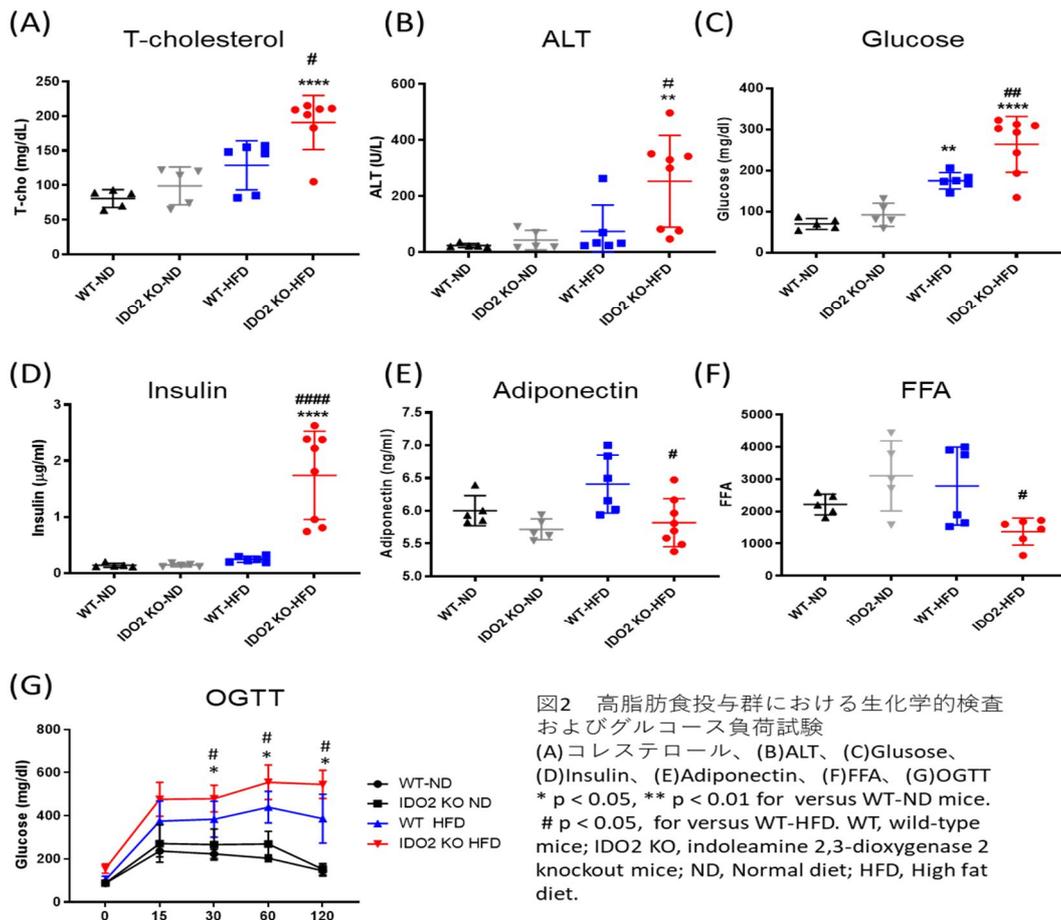


図2 高脂肪食投与群における生化学的検査
 およびグルコース負荷試験
 (A)コレステロール、(B)ALT、(C)Glucose、
 (D)Insulin、(E)Adiponectin、(F)FFA、(G)OGTT
 * p < 0.05, ** p < 0.01 for versus WT-ND mice.
 # p < 0.05, for versus WT-HFD. WT, wild-type
 mice; IDO2 KO, indoleamine 2,3-dioxygenase 2
 knockout mice; ND, Normal diet; HFD, High fat
 diet.

IDO2KO-HFD 群は WT-HFD 群に比べ、肝臓組織への脂肪沈着の亢進が認められた(図 1)。

また生化学成分では、IDO2KO-HFD 群は、空腹時血糖、総コレステロール、AST の有意な上昇が見られた(図 2)。さらに血清中インシュリンの増加、アディポネクチンの低下、遊離脂肪酸の低下が認められた。さらに耐糖能試験では、IDO2KO-HFD 群では、糖負荷後に高血糖状態が持続し、インシュリン抵抗性の亢進が認められた。また肝臓における一次代謝のメタボローム解析を行ったところ、WT マウスに比べ、IDO2KO マウスでは、解糖系および TCA 回路の代謝産物の低下が確認された。

これらの検討より、IDO2 欠損は、肝臓での代謝に影響を及ぼし、肝臓への脂肪蓄積を促進し、インシュリン抵抗性を亢進することが明らかとなった。

IDO2 欠損がインシュリン抵抗性を亢進することが明らかとなったため、高脂肪食長期投与による変化についても検討を行った。高脂肪食長期投与は、WT マウスおよび IDO2KO マウス HFD 群において、有意な体重増加と肝機能の低下が確認された。しかしながら WT-HFD 群と IDO2KO-HFD 群において、有意な差は認められなかった。

組織学的解析より、高脂肪食長期投与群では、WT マウスに比べ IDO2KO マウス群において線維化の亢進が認められた。

本検討により、IDO2 遺伝子欠損は、長期的な高脂肪食投与により肝臓の炎症を促進し、線維化の亢進につながることが明らかとなった。

IDO2KO マウスでは、WT マウスと比較してインシュリン抵抗性の亢進および肝臓への脂肪の蓄積および線維化の亢進が認められた。すなわち、IDO2 欠損は、肝臓での代謝機能に影響を与え、脂肪の蓄積の亢進ひいては、線維化の亢進を引き起こす事が明らかとなった。本検討より IDO2 は、生活習慣病の発症にかかわる重要な因子であると考えられる。

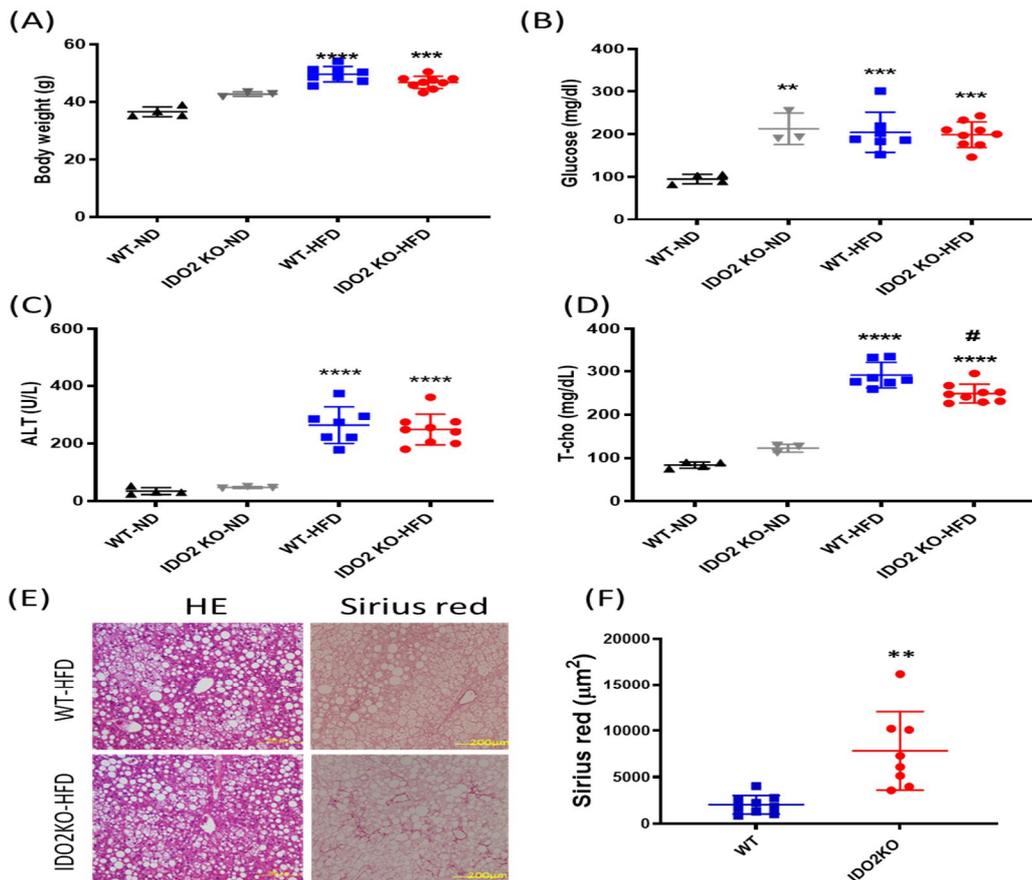


図3 高脂肪食長期投与群における生化学的検査および組織学的解析

(A)体重、(B)グルコース、(C)ALT、(D)総コレステロール

(E)肝線維化面積を評価するためのヘマトキシリン・エオジン染色とシリウスレッド染色。

(F)肝線維化面積の半定量的評価。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for versus WT-ND mice. # $p < 0.05$, for versus WT-HFD.

WT, wild-type mice; IDO2 KO, indoleamine 2,3-dioxygenase 2 knockout mice; ND, Normal diet; HFD, High fat diet.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Atsushi Suetsugu, Takafumi Naiki, Takuji Tanaka, Tomita Eiichi, Ginette Serrero, Hidetoshi Matsunami, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito.	4. 巻 11;45632211036723.
2. 論文標題 Serum GP88 as a predictive biomarker for hepatocellular carcinoma in patients with viral hepatitis C after direct-acting antiviral agents.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Biochemistry.	6. 最初と最後の頁 605-613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00045632211036723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mariko Seishima, Yasuko Yamamoto, Masashi Sakurai, Rika Sakai, Kento Fujii, Yoko Mizutani, Kuniaki Saito.	4. 巻 1
2. 論文標題 Serum Profiles of Tryptophan-Kynurenine Pathway Metabolites in Psoriasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Explor Immunol.	6. 最初と最後の頁 258-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.37349/ei.2021.00017	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 Fujii K , Yamamoto Y , Mizutani Y , Saito K , Seishima M.	4. 巻 21(15)
2. 論文標題 Indoleamine 2,3-Dioxygenase 2 Deficiency Exacerbates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 5515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155515.	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 -
1. 著者名 Yabe K, Yamamoto Y, Takemura M, Hara T, Tsurumi H, Serrero G, Nabeshima T, Saito K	4. 巻 7
2. 論文標題 Progranulin depletion inhibits proliferation via the transforming growth factor beta/SMAD family member 2 signaling axis in Kasumi-1 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Mori Yuko, Mouri Akihiro, Kunisawa Kazuo, Hirakawa Mami, Kubota Hisayoshi, Kosuge Aika, Nijijima Moe, Hasegawa Masaya, Kurahashi Hitomi, Murakami Reiko, Hoshi Masato, Nakano Takashi, Fujigaki Suwako, Fujigaki Hidetsugu, Yamamoto Yasuko, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 405
2. 論文標題 Kynurenine 3-monooxygenase deficiency induces depression-like behavior via enhanced antagonism of 7 nicotinic acetylcholine receptors by kynurenic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113191 ~ 113191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113191	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 Yabe Kuniaki, Yamamoto Yasuko, Takemura Masao, Hara Takeshi, Tsurumi Hisashi, Serrero Ginette, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Progranulin depletion inhibits proliferation via the transforming growth factor beta/SMAD family member 2 signaling axis in Kasumi-1 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05849 ~ e05849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05849	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 Sakurai Masashi, Yamamoto Yasuko, Kanayama Noriyo, Hasegawa Masaya, Mouri Akihiro, Takemura Masao, Matsunami Hidetoshi, Miyauchi Tomoya, Tokura Tatsuya, Kimura Hiroyuki, Ito Mikiko, Umemura Eri, (Boku) Aiji Sato, Nagashima Wataru, Tonoike Takashi, Kurita Kenichi, Ozaki Norio, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Serum Metabolic Profiles of the Tryptophan-Kynurenine Pathway in the high risk subjects of major depressive disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 no. 1961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58806-w	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 Hoshi Masato, Osawa Yosuke, Nakamoto Kentaro, Morita Nanaka, Yamamoto Yasuko, Ando Tatsuya, Tashita Chieko, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 438
2. 論文標題 Kynurenine produced by indoleamine 2,3-dioxygenase 2 exacerbates acute liver injury by carbon tetrachloride in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152458 ~ 152458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2020.152458	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 -

1. 著者名 Yamasuge Wakana, Yamamoto Yasuko, Fujigaki Hidetsugu, Hoshi Masato, Nakamoto Kentaro, Kunisawa Kazuo, Mouri Akihiro, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 110
2. 論文標題 Indoleamine 2,3 dioxygenase 2 depletion suppresses tumor growth in a mouse model of Lewis lung carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3061 ~ 3067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yukihiko, Fujigaki Hidetsugu, Kato Koichi, Yamazaki Kyoka, Fujigaki Suwako, Kunisawa Kazuo, Yamamoto Yasuko, Mouri Akihiro, Oda Akifumi, Nabeshima Toshitaka, Saito Kuniaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Selective and competitive inhibition of kynurenine aminotransferase 2 by glycyrrhizic acid and its analogues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46666-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本康子、藤垣英嗣、齋藤邦明
2. 発表標題 疾患バイオマーカーとしてのトリプトファン キヌレニン経路
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川雅樹、山本康子、齋藤邦明
2. 発表標題 トリプトファン代謝酵素 indoleamine 2,3-dioxygenase 2欠損が脳内に及ぼす影響
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 助田 菜緒, 藤垣 英嗣, 安藤 穂乃実, 山本 康子, 齋藤 邦明
2. 発表標題 Cysteine conjugate beta-lyase1阻害によるCisplatin誘発性腎障害保護効果
3. 学会等名 第61回 日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 里佳, 山本康子, 藤垣英嗣, 齋藤邦明
2. 発表標題 Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2)欠失による乾癬病態増悪のメカニズム解明
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 里佳, 山本康子, 藤垣英嗣, 齋藤邦明
2. 発表標題 Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2)欠失による乾癬病態増悪のメカニズム解明
3. 学会等名 日本トリプトファン研究会第40回学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分 担 者	藤垣 英嗣 (Fujigaki Hidetsugu) (00612631)	藤田医科大学・保健学研究科・准教授 (33916)	

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
---------	---------