

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：30126

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19610

研究課題名(和文)「パネート細胞 ディフェンシン」に着眼した2型糖尿病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation into the pathogenic mechanism of type 2 diabetes focusing on Paneth cell alpha-defensins

研究代表者

加藤 剛寿 (Kato, Takatoshi)

札幌保健医療大学・保健医療学部・講師

研究者番号：00756421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はPaneth細胞 ディフェンシンを介した2型糖尿病の発症メカニズムを解明することを目的としている。2型糖尿病発症モデルマウスであるdb/dbマウスを用いて ディフェンシン分泌量、腸内細菌叢の解析を行なった結果、血糖値の上昇に伴って ディフェンシン分泌量は減少し、腸内細菌叢は有意に異なる多様性を示した。さらに、db/dbマウスに摂食制限の介入試験を行い、ディフェンシン分泌量は低下せず実験開始時の値を維持し、血糖値は低下した。

以上より、過食によるPaneth細胞 ディフェンシン分泌量の低下に伴う腸内細菌叢のdysbiosisを介した2型糖尿病発症メカニズムの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

わが国では糖尿病患者数は約2050万人(可能性の者を含める)と推計され、この15年間で約680万人増加している。糖尿病は三大合併症をはじめ種々の血管疾患を併発させることから患者の生活の質を低下させ、国民医療費も増大させることから非常に深刻な問題であり、新たな発症メカニズムを解明する必要がある。

本研究は過食によるPaneth細胞 α -defensinの分泌量低下に伴う腸内細菌叢のdysbiosisを介した2型糖尿病発症メカニズムの可能性が示唆された。

本研究はわが国および世界で急増している2型糖尿病の新たな治療戦略や発症予防を検討する基盤となり得るものであり、社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study was to reveal the pathogenic mechanism of type 2 diabetes mellitus(T2DM) which was involved in Paneth cell α -defensins.

This study analyzed secreted α -defensins levels and the intestinal microbiota using the db/db mice which was the animal model of T2DM. Consequently, secreted α -defensins levels were reduced with increase of the blood glucose levels, and the intestinal microbiota showed significantly different α -diversity. Furthermore, this intervention study of the dietary restriction in db/db mice show that the dietary restriction suppressed the decrease of α -defensins, maintained the amount of α -defensins at the start of experiment, and decreased the blood glucose levels.

Therefore, this report suggests the pathogenic mechanism of T2DM which mediated via dysbiosis of the intestinal microbiota along with the reduction in Paneth cell α -defensins through the overeating.

研究分野：慢性看護

キーワード：パネート細胞 ディフェンシン 腸内細菌叢 2型糖尿病 過食

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は世界で2015年に4億人を超え、2040年には1.5倍の6億人を突破すると推測されており、糖尿病は種々の血管疾患を併発させることから非常に深刻な問題である。わが国でも糖尿病患者数は約2000万人(可能性の者を含める)と推計され、1997年から2016年までの約20年間で約630万人増加しており、糖尿病の国民医療費(2015年)は1兆2356億円である。人工透析の第1位(約4割)が糖尿病腎症であることや、視覚障害の第2位が糖尿病網膜症であることを考えると、糖尿病は数値に表れている以上の医療費が費やされていると推測できる。なかでも、2型糖尿病は糖尿病の90%以上と大部分を占めることから、2型糖尿病の発症予防が必要であり、発症予防のためには2型糖尿病の発症メカニズムを解明することが急務である。

こうした中、近年、糖尿病患者における腸内細菌叢の組成異常(dysbiosis)が知られている。dysbiosisに伴い血液中に移行した腸内細菌が慢性炎症を引き起こし、血糖値を上昇させることが知られている。さらに、食物繊維が腸内環境を変え、血糖値を改善させることが報告されている。以上より、糖尿病の発症に腸内細菌叢のdysbiosisが関与していると考えられてきている。

また、腸内細菌叢の組成の制御因子として、小腸のパネート(Paneth)細胞が分泌するディフェンシン(-defensin)が知られている。具体的には、Paneth細胞-defensinは常在菌に対してはほとんど殺菌活性を示さない一方、病原菌に対しては強い殺菌活性を示す選択的殺菌活性により、腸内細菌の共生と排除に関与していることが報告されている。また、ヒトの-defensin(HD5)遺伝子をマウスのPaneth細胞に導入したDEFA5tg(+/-)マウスにおいて、Firmicutes門比率の減少とBacteroidetes門比率の増加がみられたことから、Paneth細胞-defensinが腸内細菌叢の組成形成に影響を与えていることが知られている。

以上のことから、Paneth細胞-defensinの分泌低下が腸内細菌叢のdysbiosisを来し、血糖コントロール悪化を招くという2型糖尿病の発症メカニズムの仮説を考えるに至った。しかし、Paneth細胞-defensinが2型糖尿病の発症メカニズムに関与する報告はこれまでない。

2. 研究の目的

Paneth細胞-defensinを介した2型糖尿病の発症メカニズムを解明することを目的とする。具体的には、2型糖尿病モデルマウスを対象とし、Paneth細胞の減少が-defensinの分泌障害をもたらす、腸内細菌叢の組成異常を来し血糖コントロール悪化を招くことを解明する。

3. 研究の方法

1) 本研究は以下の2段階で実施した。

【第1段階】

Paneth細胞の減少が-defensinの分泌障害をもたらす、腸内細菌叢の破綻を介して糖尿病を発症することを検証するため、2型糖尿病発症モデルマウスであるdb/dbマウスを用いて体重、血糖値、Paneth細胞数、Paneth細胞-defensin分泌量、腸内細菌叢の解析を行なった。

db/dbマウス、db/+マウスを6匹ずつ6週齢で購入し、6週齢から9週齢まで1週間毎に、体重、-defensin(Crp1)分泌量、腸内細菌叢、血糖値を解析した。体重は電子天秤(A&D EJ-1500)、Crp1分泌量は糞便を凍結乾燥しサンドイッチELISAで測定、腸内細菌叢は新鮮便を16S rRNAメタゲノム解析、血糖値は尾静脈を注射針で穿刺し血液を採取しラボグルコ(ForaCare 4239R1006)で測定、Paneth細胞数は腸管組織をホルマリン固定免疫蛍光染色および透明化処理し、共焦点レーザー顕微鏡で計測した。なお、db/dbマウスが10週齢で死亡したことによりn=5となる。餌はCE-2(CLEA Rodent Diet)を使用し自由摂食とした。

【第2段階】

db/dbマウスにおいて-defensin分泌量の減少を引き起こす要因が過食による影響であるかを明らかにするため、db/dbマウスに摂食制限(C57BL/6マウスと同程度の摂取量で設定)の介入試験を行った。

(1) 摂食制限群の餌の量の算出

事前に摂食制限群の餌の量を決定するため、C57BL/6マウス(C57BL/6J)8匹を(株)日本クレアから6週齢で購入し、CE-2(粉末状)を摂取させ食事を測定した。餌ケースに20gをセットし24時間後、残量を計測し、20gから残量を除いた値を1日の食事摂取量とし算出した。なお、馴化期間と血糖測定前日の絶食期間を除く7週齢~11週齢における全ての日を測定し、平均摂食量を算出した。

(2) 摂食制限試験

db/dbマウス14匹を5週齢で購入し、1週間の馴化後、自由摂食群、摂食制限群の2つの群に7匹ずつ群分けを行った。群分けの際は体重の平均値が近づくような組み合わせになるよう考慮して行った。6週齢から9週齢まで1週間毎に、-defensin(Crp1)分泌量、血糖値を測定した。Crp1分泌量は糞便を凍結乾燥しサンドイッチELISAで測定、血糖値は尾静脈を注射針で穿刺し血液を採取しグルテストミント(13B1X10144000011)で測定した。摂食制限群のdb/dbマウスに、上述の(1)で算出した餌の量と同等量を毎日与えた。

2) 実験動物

使用したマウスは2型糖尿病発症モデルマウス(BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl)(以下、db/dbマウスとする)、対照群としてdb/+マウス(BKS.Cg-m+/+Lepr^{db}/Jcl)であり、いずれも(株)日本クレアから6週齢で購入した。

本研究におけるすべての動物実験は、国立大学学校法人北海道大学動物実験委員会の承諾を受け、国立大学学校法人北海道大学動物実験に関する規定に基づいて行った。

3) Paneth細胞数の計測

マウスから小腸を摘出後、遠位端0.5cmの組織片を回腸として採取し、縦切開後、室温4%PFA中に2時間固定した。0.5%TritonX-100 in PBSで一晩透明化処理し、10%Goat serum, 0.5% TritonX-100 in PBSにて4でブロッキング処理をした。その後、TritonX-100, Goat serum in PBSで希釈した1次抗体(抗Crp1抗体:77-R63)を加え4で1日反応させた。その後、Wash bufferで1時間のwashを2回行った後、4で一晩washした。その後、2次抗体(FITC labeled Rat anti cryptdin-1)を加え、washを同様に行い、DAPI 1000倍希釈で室温30分間遮光して反応させた。反応終了後、washし、RapiClearにより透明化した。

サンプルの3次元画像は共焦点レーザー顕微鏡(A1,Nikon)と0.95NA対物レンズ(CFI Apo LWD20X WI S,Nikon)を用いて取得した。Zスタックは1 μ m間隔とした。取得した画像データの処理および解析はNIS-elements AR(Nikon)を使用した。1陰窩中のPaneth細胞数を計測する際、設定した範囲(0.04 mm²)内にある5~10個のすべての陰窩に存在するPaneth細胞数を計測した。1匹のマウスから得られたサンプルの3視野を撮影し、その平均値を求めた。

4) Crp1-defensin分泌量の測定

(1) 糞便サンプルの調整

各対象マウスから約24時間分の糞便を回収し、VD-550R(TAITEC)を用いて凍結乾燥させ30で保存した。糞便をBEADS CRUSHER μ T-12(TAITEC)を用いて粉碎(3200r/min)した。粉碎した糞便30mgにPBS(-)を300 μ L加え、Micro tube mixer MT-400(TOMY)を用いて4で16時間攪拌した。その後、遠心分離し得られた上清をCrp1のsandwich ELISAのサンプルとして用いた。

(2) Sandwich ELISA

96well 平底プレートにCarvionate Bicarbonate Buffer, pH9.6(Sigma)に溶解した1 μ g/mLの固相化抗体(所属研究室で樹立したラットモノクローナル抗Crp1抗体:77-R5)を添加し、4で一晩反応させることにより固相化した。次に、PBS-Tで4倍希釈したブロックエースを24で90分間反応させ、ブロッキングを行った。その後、検量線作成に用いるPBS(-)に溶解した合成Crp1と糞便上清サンプルを添加して24で60分間反応させた。

検量線は、合成Crp1が0~4ng/mLの濃度になるよう調整した。次に、0.5 μ g/mLのビオチン標識検出抗体(所属研究室で樹立したラットモノクローナル抗Crp1抗体:77-R20)を24で60分間反応させた。PBS-Tで5000倍希釈したHRP標識ストレプトアビジン(GE Healthcare)を添加し24で60分間ビオチンと結合反応させた後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)(SureBlue,KPL)を添加して24で30分間反応させ、HRPによる酵素反応により発色を行った。0.6Nの硫酸を添加することで発色反応を止め、OD(450/620nm)値をMultiscan FC(Thermo)で測定した。各反応の洗浄にはPBS-Tを用いた。

5) 腸内細菌叢解析

(1) 糞便サンプルの採取およびDNA抽出

各マウスから排泄直後の糞便を採取し、ドライアイス上で瞬間冷却したのち、30で保存した。その後、total DNAをQIAmp Fast DNA Stool Mini kit(Qiagen)を用いて抽出した。

(2) 16S rDNAの増幅、配列決定および多様性解析

糞便より得たtotal DNA5ngを鋳型として、illumina overhang adaptor 配列を付加した16S rDNA V3-V4領域特異的なプライマーを用いて1段階目のPCRを行った。次に、精製した増幅産物5 μ Lを鋳型として、Nextera XT Index Kit v2(illumina)を用いてサンプル毎にindexを付加し2段階目のPCRを行った。PCR産物を精製後、Qubit 2.0 Fluorometer(Thermo)を用いて、PCR産物の濃度を測定した。各サンプルを4nMに希釈したのち、すべてのサンプルを等量ずつ混合してライブラリーを得た。ライブラリー4 μ Lを鋳型として、KAPA Library Quantification Kit Light Cyclor480 qPCR Mix KK4854(illumina)を用いたリアルタイムPCRによる標的配列の絶対定量を行った。MiSeq sequencing platform(illumina)により、illumina sequencing プロトコルに従い、250bpペアエンドシーケンスにより解析した。得られた塩基配列は、Trimmomatic v0.32を用いて、アダプター配列除去、クオリティフィルタリングを行ったのち、BaseSpace Application 16S Metagenomics version 1.0.1(illumina)にて97%の相同性を有する配列を同一のOTUとして分類した。さらに、各OTUの代表配列をGreenGenes databaseに対してBLAST検索することで腸内細菌叢組成を解析し、QIIME2にて多様性(Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac)を解析した。

6) 統計学的解析

測定値は平均±標準誤差で示し、Unpaired student's t-test、One-way ANOVA、およびTwo-way ANOVAを用いた。なお、One-way ANOVA、およびTwo-way ANOVAで差が認められた場合、事後検定としてBonferroni's multiple comparison testを行った。また、相関の解析にはPearsonの相関係数を用いた。腸内細菌叢の多様性についてはPERMANOVAを行った。全ての統計学的解析で危険率5%未満(p<0.05)を有意とした。

4. 研究成果

【第1段階】

db/db マウスは Paneth 細胞数の減少、Crp1 分泌量の低下、腸内細菌叢の組成変化、血糖値の上昇を示した。

実験開始時期の6週齢におけるdb/dbマウスの体重は31.6±0.6g、db/+マウスの体重は23.1±0.2gであり、db/dbマウスの体重は6週齢から9週齢までいずれも有意に高値であった(p<0.001)(図1)。9週齢におけるdb/dbマウスの血糖値は500.4±54.6mg/dL、db/+マウスの血糖値は133.3±5.7mg/dLであり、7~8週齢で有意差がなかった血糖値が9週齢でdb/dbマウスが有意に高かった(p=0.0147)。

ただし、6週齢におけるdb/dbマウスの血糖値は168.2±15.3mg/dL、db/+マウスの血糖値は95.0±6.2mg/dLであり6週齢においても有意差があった(p=0.0385)(図2)。7週齢におけるdb/dbマウスのCrp1量は64.6±9.2ng/mLであり、db/+マウスのCrp1量(109.1±6.2ng/mL)よりも有意に低く(p=0.0325)。その後の8、9週齢においても有意に低かった(p=0.0007, p=0.0055)(図3)。なお、db/dbマウスの1陰窩あたりのPaneth細胞数は15.1±0.6個であり、db/+マウスの17.8±0.7個に比べ有意に少なかった(p=0.0203)(図4)ことから、db/dbマウスのCrp1分泌量が減少した要因がPaneth細胞数減少に伴う可能性が示唆された。Crp1分泌量と血糖値の相関についてみると、7週齢(r=-0.700, p=0.011)、8週齢(r=-0.732, p=0.007)、9週齢(r=-0.816, p=0.002)で血糖値と有意に強い逆相関を示した(図5)。db/dbマウスの腸内細菌叢は7週齢以降、db/+マウスとは有意に異なる多様性を示した(Bray-Curtis:p=0.005, Jaccard:p=0.008, Unweighted Unifrac:0.044)(表1)。

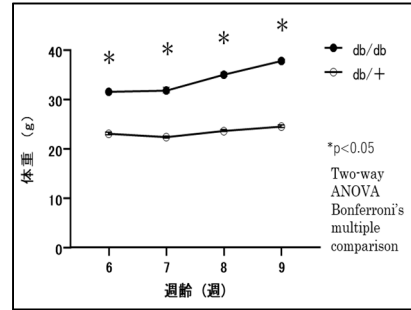


図1 体重の比較

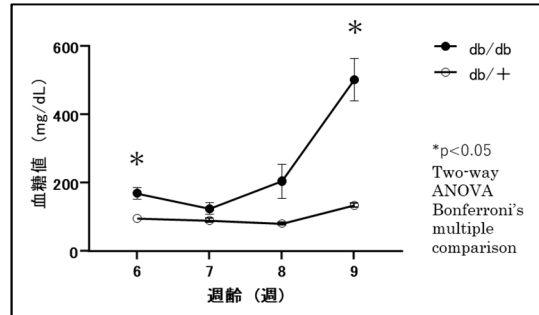


図2 血糖値の比較

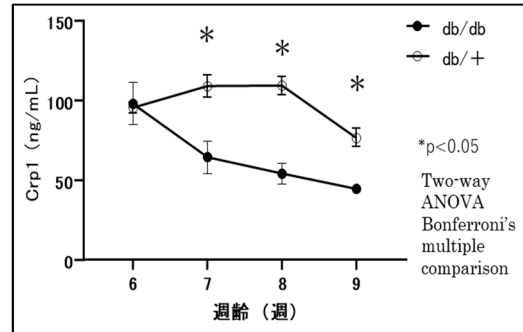


図3 Crp1分泌量の比較

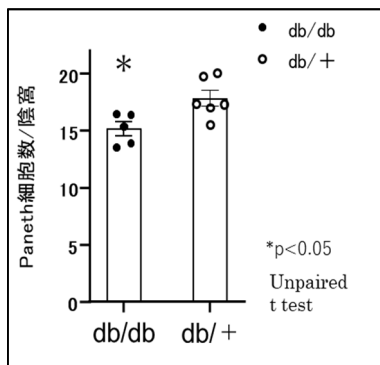


図4 Paneth細胞数の比較

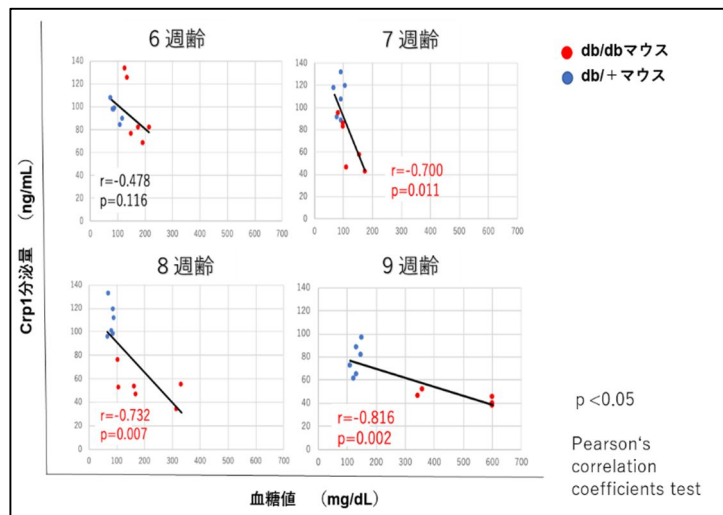


図5 血糖値とCrp1の相関

表 1 腸内細菌叢 (多様性) の比較

週齢 (週)	Bray-Curtis	Jaccard	Unweighted Unifrac	Weighted Unifrac
6	0.419	0.052	0.217	0.411
7	0.005*	0.008*	0.044*	0.158
8	0.005*	0.004*	0.006*	0.002*
9	0.003*	0.016*	0.025*	0.014*

*p<0.05 p value in pairwise PERMANOVA

【第 2 段階】

摂食制限した db/db マウスの Crp1 分泌量は低下せず、実験開始時の値を維持した。

摂食制限群の餌の量の算出にあたって事前に行った C57BL/6 マウスの餌の平均摂取量を算出する実験において、平均摂取量は 1 日 4.2g であった。

db/db マウス (摂食制限介入) の実験開始 6 週齢における Crp1 量は 51.9 ± 4.2 ng/dL であり、3 週後の 9 週齢においても 64.7 ± 8.4 ng/dL あり、Crp1 分泌量は第 1 段階の摂食制限を行わない自由摂食の db/db マウスのように低下せず、実験開始時の値を維持した。なお、9 週齢において、db/db マウス (摂食制限介入) の血糖値は 233.0 ± 21.8 mg/dL であり、db/db マウス (非介入群) の血糖値 500.4 ± 54.6 mg/dL に比べ約半分以下となった (図 6)。

以上より、摂食制限に伴う Crp1 分泌量低下の抑制が血糖値を低下させる要因となった可能性が示唆された。

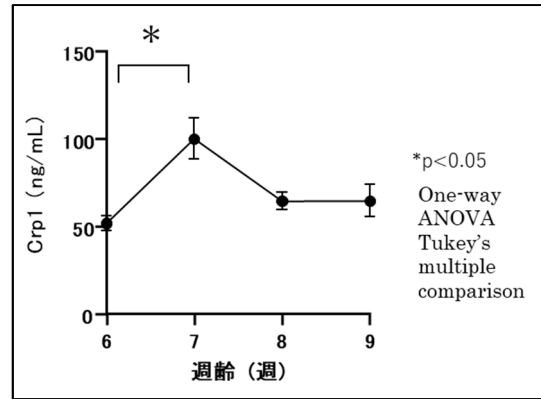


図 6 db/db マウス (摂食制限介入) における Crp1 分泌量の経時的変化

5. まとめ

本研究は Paneth 細胞 ディフェンシン (α-defensin) を介した 2 型糖尿病の発症メカニズムを解明することを目的としている。2 型糖尿病発症モデルマウスである db/db マウスを用いて α-defensin 分泌量、腸内細菌叢の解析を行なった結果、血糖値の上昇に伴って α-defensin 分泌量は減少し、腸内細菌叢は有意に異なる多様性を示した。さらに、db/db マウスに摂食制限の介入試験を行い、α-defensin 分泌量は低下せず実験開始時の値を維持し、血糖値は有意に低下した。

以上より、過食による Paneth 細胞 α-defensin 分泌量の低下に伴う腸内細菌叢の dysbiosis を介した 2 型糖尿病発症メカニズムの可能性が示唆された (図 7)。

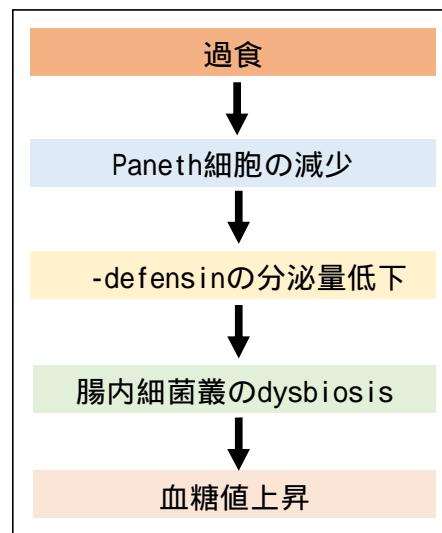


図 7 2 型糖尿病の発症メカニズム (仮説)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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