

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20187

研究課題名（和文）発酵食品の内臓脂肪の自然リンパ球を介した糖尿病発症抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of fermented foods inhibit the development of diabetes via innate lymphocytes in visceral fat

研究代表者

橋本 善隆（Hashimoto, Yoshitaka）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：70806140

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）：糖尿病患者の増加の一因として食習慣の欧米化に伴う、腸内細菌叢の変化していることが考えられている。本課題では、腸内細菌の改変が内臓脂肪組織での2型自然リンパ球（ILC2）の活性化を介して慢性炎症を引き起こしていることおよび発酵食品の効果を明らかにすることを目的として研究を実施した。内臓脂肪のILC2は内臓脂肪に発現している脂肪酸トランスポーターであるCD36の発現抑制を介し飽和脂肪酸の内臓脂肪への流入を抑制し、内臓脂肪での慢性炎症の抑制、糖尿病発症を抑制していることが明らかとなった。また、発酵食品を摂取すること、内臓脂肪の蓄積が抑制されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病が増加している背景には食習慣の欧米化とそれに伴う内臓脂肪での慢性炎症が挙げられる。内臓脂肪の2型自然リンパ球は欧米化食に多く含まれる飽和脂肪酸が内臓脂肪への流入を抑制することで慢性炎症を防ぎ、糖尿病発症を抑制する働きがあることが明らかとなった。さらに、日本伝統の発酵食品を摂取することで、内臓脂肪の蓄積を抑制する効果があることが明らかとなった。

本研究より、糖尿病の発症予防・改善のために食習慣を見直すことの重要性が明らかになったと考える。

研究成果の概要（英文）： The change in gut microbiota, due to the westernization diet, is thought to be one of the reasons for the increase in the number of patients with diabetes.

In this study, we aimed to clarify the effect of fermented foods on chronic inflammation through the activation of type 2 innate lymphocytes (ILC2) in visceral adipose tissue.

We revealed that ILC2 in visceral fat suppressed the influx of saturated fatty acids into visceral fat through the suppression of expression of CD36, a fatty acid transporter expressed in visceral fat, thereby suppressing chronic inflammation in visceral fat and the development of diabetes. It was also found that consumption of fermented foods suppressed the accumulation of visceral fat.

研究分野：内分泌・糖尿病・代謝

キーワード：糖尿病 内臓脂肪 自然リンパ球 慢性炎症 飽和脂肪酸 発酵食品

1. 研究開始当初の背景

摂取カロリーは増加することなくむしろ減少傾向を呈しているにも関わらず、糖尿病患者数は増加しており、食事の欧米化が糖尿病発症に寄与していることが考えられる。

申請者は先行研究で日本人糖尿病患者と性別、年齢がマッチした非糖尿病患者での検討で、糖尿病において腸内細菌叢がかく乱されていることを明らかとしている。

糖尿病において内臓脂肪での慢性炎症が重要な役割を果たしており、2010年に発見された自然リンパ球(ILC)は、抗原特異的な活性化を必要としない自然免疫系リンパ球で、慢性炎症を制御している可能性が考えられている。

近年の報告で腸内細菌が腸管の ILC に影響を与えることが明らかとされているが、内臓脂肪の ILC、特に 2 型自然リンパ球(ILC2)、に与える影響については明らかとなっていない。また、日本伝統の発酵食品の糖尿病に対する防護的作用についても明らかとなっていない。

2. 研究の目的

現代食が腸内細菌叢のかく乱を介し内臓脂肪組織在住 ILC2 の活性化を障害し慢性炎症・インスリン抵抗性が発症する機序を解明する。またわが国伝統の発酵食品の抗糖尿病効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)欧米食の腸内細菌叢および内臓脂肪の ILC への影響の解明

C57/BL6 マウス 10 匹に 8 週齢から 12 週齢にかけて普通食摂餌のうえ腸内殺菌(アンピシリン 1g/L、ネオマイシン 1g/L、バンコマイシン 0.5g/L を飲水摂取)を実施する。そのうえで、8 週齢から 20 週齢にかけて各群 5 匹で高脂肪高シヨ糖食(欧米食、HF/HS 食)負荷を行い、20 週齢でサクリファイスを実施した。

評価項目：体重の推移；耐糖能：IPGTT、ITT を評価；小腸：HE 染色、腸絨毛および腸陰窩を評価；小腸の免疫細胞の評価：マルチカラーフローサイトメトリー；小腸の Real Time PCR：tnfa,pparg,il1b,il23a,il22,fasn,ccl2,cd36,evol6,scd1；便および血清のリピドーム解析：ガスクロマトグラフィー分析計を用いて飽和脂肪酸(ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸)；腸内細菌：16S rRNA 菌叢解析

(2)糖尿病発症における ILC2 の役割を明らかにする

ILC2 の増加に密接に関与している IL-33 の受容体である ST2 欠損マウス(ST2KO)マウスおよび C57/BL6 マウス各群 5 匹を用いて 8 週齢から 20 週齢にかけて普通食もしくは HF/HS 食負荷を行い、20 週齢でサクリファイスを実施した。

評価項目：体重の推移；耐糖能：IPGTT、ITT を評価；免疫細胞の評価：マルチカラーフローサイトメトリー；Real Time PCR：tnfa,pparg,il1b,il13,il33,fasn,cd36；リピドーム解析：飽和脂肪酸(ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸)

C57/BL6 マウスおよび ST2KO マウス各群 5 匹を用いて 8 週齢から 20 週齢にかけて HF/HS 食負荷を行い 18 週および 19 週齢時に IL33 を経静脈投与を実施し、20 週齢でサクリファイスを実施した。

評価項目：体重の推移；耐糖能：IPGTT、ITT を評価；免疫細胞の評価：マルチカラーフローサイトメトリー；Real Time PCR：tnfa,pparg,il1b,il13,il33,fasn,cd36；リピドーム解析：飽和脂肪酸(ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸)

ST2KO マウスに CD45.1 マウスの骨髄より cell sorter を用いて分離した ILC を 6 週から 8 週齢にかけて 4 回経静脈投与を実施し、16 週齢でサクリファイスを実施した。

評価項目：体重の推移；耐糖能：IPGTT、ITT を評価；免疫細胞の評価：マルチカラーフローサイトメトリー；Real Time PCR：tnfa,pparg,il1b,il13,il33,fasn,cd36；リピドーム解析：飽和脂肪酸(ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸)

(3)発酵食品の糖尿病に対する防護作用を明らかにする

京都府立医科大学大学院医学研究内分泌・代謝内科で実施している糖尿病患者を対象としたコホート研究である KAMOGAWA-DM 研究参加者に関して発酵食品であるみそ摂取量と内臓脂肪および血糖コントロールの関連について検討を実施した。

4. 研究成果

(1) 欧米食の腸内細菌叢および内臓脂肪の ILC への影響の解明

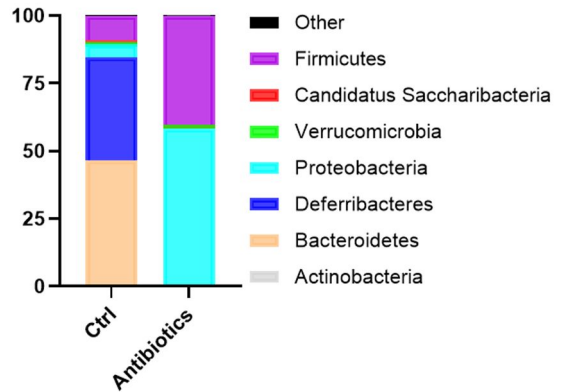
抗生剤投与群ではコントロール群と比較して経口摂取量は変わらないにもかかわらず、体重および内臓脂肪の増加および耐糖能障害を認めた。

抗生剤投与群ではコントロール群と比較して虫垂重量の低下、小腸の腸絨毛の高さと幅の低下と腸陰窩の深さの増加を認めた。

小腸での自然リンパ球およびマクロファージを評価したところ、抗生剤投与群ではコントロール群と比較して ILC1 の増加、ILC2 および ILC3 の減少、M1 マクロファージの増加、M2 マクロファージの減少を認めた。また Real Time PCR において抗生剤投与群ではコントロール群と比較して TNF の増加、PPAR の減少を認めた。また ILC1 や M1 マクロファージから分泌される IL23 や IL1 の分泌増加、ILC3 から分泌される IL22 の分泌低下を認めた。

飽和脂肪酸関連遺伝子発現の増加も認めた。リポドーム解析により抗生剤投与群ではコントロール群と比較して便中の飽和脂肪酸は減少し、血清中の飽和脂肪酸が増加を認めた。

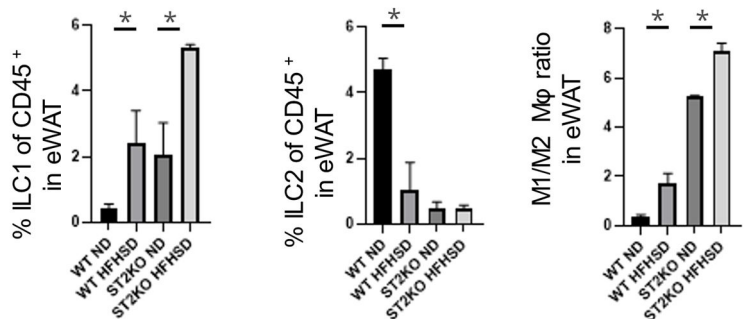
さらに、腸内細菌についても検討したところ、抗生剤投与群ではコントロール群と比較して多様性の低下(右図)、および肥満の指標の一つとされるファームキューティス/バクテロイデス門比の増加を認めた。



(2) 糖尿病発症における ILC2 の役割

野生型マウスでは高脂肪高ショ糖食により体重、内臓脂肪の増加・耐糖能障害を認めたが、ST2 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して高脂肪高ショ糖食により体重に有意な増加は認めないが、内臓脂肪の増加・耐糖能障害が高度であった。HFHS 食により野生型マウスでの脂肪細胞の肥大・ベージュ化の指標である Ucp-1 の発現低下を認めたが、ST2KO マウスではこれらの変化がより高度であった。

内臓脂肪内のマクロファージおよび ILC2 について確認したところ、HFHS 食により野生型マウスでは内臓脂肪内の ILC1 の増加、ILC2 の減少、M1/M2 マクロファージの比は増加していた。一方、ST2KO マウスでは ILC2 には変化はありませんでしたが、ILC-1 および M1/M2 マクロファージの比の増加は野生型マウスより高度であった(右図)。

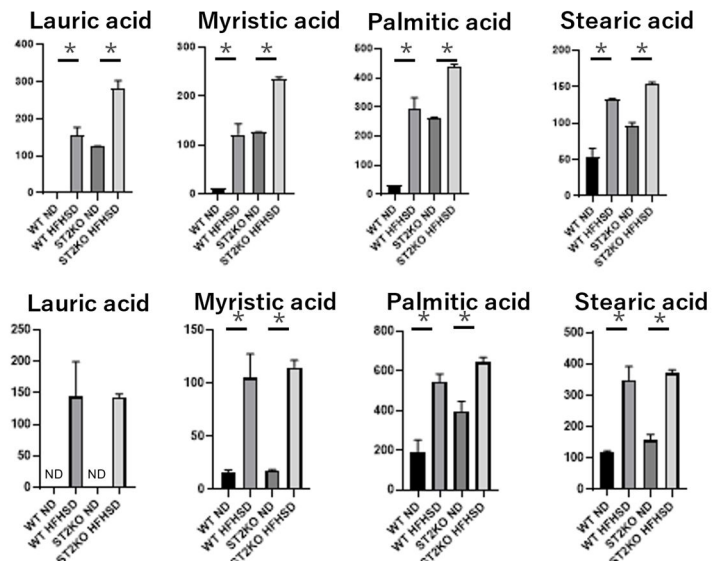


内臓脂肪内の炎症性サイトカインに関して確認したところ、HF/HS 食により野生型マウスでは IL1 の増加、CD36 の発現増強および炎症性サイトカインの分泌の増加を認めた。一方、ST2KO マウスでは IL1 の増加、CD36 の発現増強および炎症性サイトカインの分泌の増加はより高度であった。また ST2KO マウスでは ILC2 が機能していないため IL33 の分泌も高度であった。

内臓脂肪内および血清中の飽和脂肪酸の濃度を確認したところ、飽和脂肪酸が HF/HSD により野生型マウスでも増加していたが、ST2KO マウスでは特に内臓脂肪内での増加が高度であった(右図)。

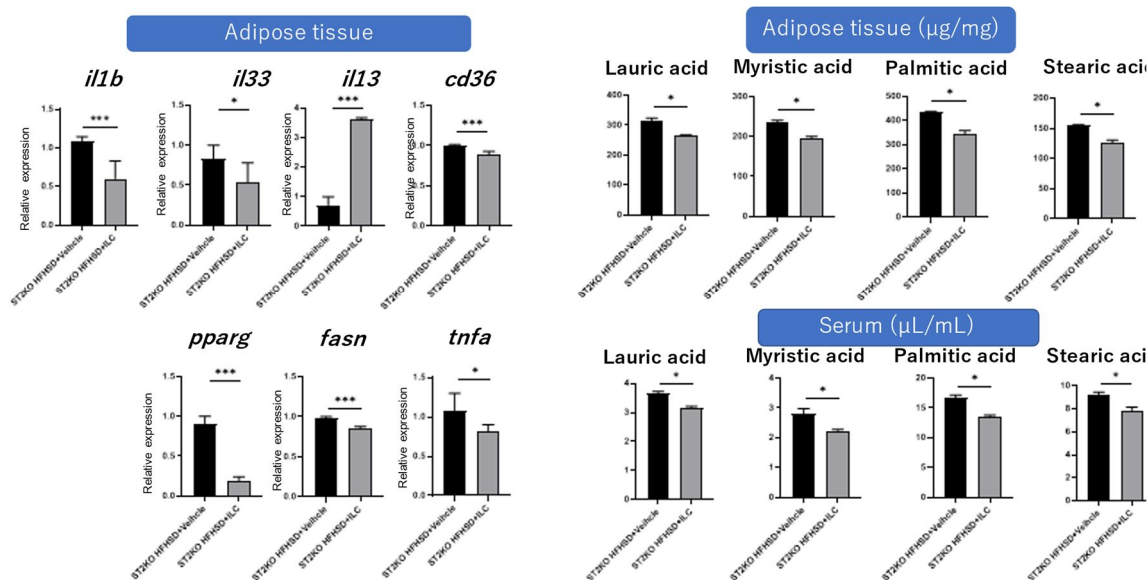
Adipose tissue (μg/mg)

Serum (μL/mL)



次に HFHS 食を投与している野生型マウスおよび ST2K0 マウスに IL-33 の投与を行った。野生型マウスでは ILC2 の増加および M1/M2 マクロファージ比の改善とともに、耐糖能が改善を認められたが、IL33 の受容体である ST2K0 マウスでは改善を認めなかった。野生型マウスでは IL-33 投与により脂肪細胞のサイズ縮小及び Ucp-1 の発現増強を認められたが ST2K0 マウスでは変化を認めなかった。さらには野生型マウスでは IL-33 投与により IL13 や IL5 といったから ILC2 から分泌されるサイトカインの分泌が増加するとともに CD36 の発現低下、炎症性サイトカインの抑制、飽和脂肪酸濃度の改善を認められたが、ST2K0 マウスではこれらの変化は認めなかった。

一方で、ILC を移植することで ST2K0 マウスの体重及び内臓脂肪量の増加が抑制、耐糖能障害の改善、および脂肪細胞のサイズが小型化、ベージュ化の促進も認められた。さらに、ST2K0 マウスで認められた炎症性サイトカインの増加、飽和脂肪酸の増加の改善を認められた(下図)。



これらの結果より、HFHS 食による過剰な飽和脂肪酸の内臓脂肪内への流入を ILC2 が内臓脂肪の飽和脂肪酸のトランスポーターである CD36 の発現制御を介して抑制していることを明らかにすることができた。

(3)発酵食品の糖尿病に対する防護作用

糖尿病患者を対象としたコホート研究である KAMOGAWA-DM 研究参加者に関して発酵食品であるみそ摂取量と内臓脂肪および血糖コントロールの関連について検討を実施した。

習慣のみそ摂取者はそうでない者と比較して体脂肪量が少ないことが明らかとなった(下表、参考文献 1)。

	Men, n = 192			Women, n = 159		
	Habitual Miso Consumption (-) n = 23	Habitual Miso Consumption (+) n = 169	<i>p</i>	Habitual Miso Consumption (-) n = 26	Habitual Miso Consumption (+) n = 133	<i>p</i>
Body weight, kg	66.5 (10.6)	66.9 (11.5)	0.906	62.5 (11.5)	57.2 (11.2)	0.022
Body mass index, kg/m ²	24.2 (2.9)	23.9 (3.8)	0.567	27.3 (5.3)	24.7 (5.0)	0.022
Body fat mass, kg	18.6 (6.1)	17.0 (7.8)	0.189	25.6 (9.6)	20.4 (8.7)	0.009
Percent body fat mass, %	27.4 (5.6)	24.4 (7.2)	0.056	39.3 (7.3)	33.8 (8.0)	0.001

また、女性においては習慣のみそ摂取者はそうでない者と比較して血糖コントロールおよび変動が良好であることがあきらかとなった(下表、参考文献 2)。

	Men, n = 160			Women, n = 130		
	Habitual Miso Consumption (-) n = 19	Habitual Miso Consumption (+) n = 141	<i>p</i>	Habitual Miso Consumption (-) n = 23	Habitual Miso Consumption (+) n = 107	<i>p</i>
Average HbA1c, %	7.2 [6.4-7.7]	7.0 [6.6-7.5]	0.947	7.3 [6.8-8.4]	7.0 [6.4-7.5]	0.009
SD of HbA1c	0.27 [0.14-0.38]	0.20 [0.14-0.32]	0.603	0.37 [0.20-0.72]	0.21 [0.12-0.32]	0.004
CV of HbA1c	0.04 [0.02-0.05]	0.03 [0.02-0.05]	0.572	0.05 [0.03-0.09]	0.03 [0.02-0.04]	0.005

本研究課題により食習慣の欧米化により内臓脂肪内での飽和脂肪酸の吸収が増加することを介して慢性炎症を引き起こしていること、そしてこの慢性炎症に対して内臓脂肪の 2 型自然リンパ球が保護的に働いていることを明らかにできた。また、伝統的発酵食品であるみそを習慣的に摂取している糖尿病患者ではそうでない患者と比較して、肥満が少なく、血糖コントロールも良好であることを明らかにできた。

参考文献 1: Takahashi F, Hashimoto Y, et al. Habitual Miso (Fermented Soybean Paste) Consumption Is Associated with a Low Prevalence of Sarcopenia in Patients with Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study. *Nutrients*. 2020; 13: 72.

参考文献 2: Takahashi F, Hashimoto Y, et al. Habitual Miso (Fermented Soybean Paste) Consumption Is Associated with Glycemic Variability in Patients with Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study. *Nutrients*. 2021; 13: 1488.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Fuyuko, Hashimoto Yoshitaka, Kaji Ayumi, Sakai Ryosuke, Miki Akane, Okamura Takuro, Kitagawa Noriyuki, Okada Hiroshi, Nakanishi Naoko, Majima Saori, Senmaru Takafumi, Ushigome Emi, Hamaguchi Masahide, Asano Mai, Yamazaki Masahiro, Fukui Michiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Habitual Miso (Fermented Soybean Paste) Consumption Is Associated with Glycemic Variability in Patients with Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1488 ~ 1488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13051488	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 Takahashi Fuyuko, Hashimoto Yoshitaka, Kaji Ayumi, Sakai Ryosuke, Kawate Yuka, Okamura Takuro, Kitagawa Noriyuki, Okada Hiroshi, Nakanishi Naoko, Majima Saori, Senmaru Takafumi, Ushigome Emi, Hamaguchi Masahide, Asano Mai, Yamazaki Masahiro, Fukui Michiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Habitual Miso (Fermented Soybean Paste) Consumption Is Associated with a Low Prevalence of Sarcopenia in Patients with Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 72 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13010072	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村拓郎、橋本善隆、濱口真英、山崎真裕、福井道明
2. 発表標題 2型自然リンパ球は内臓脂肪のベージュ化を介して耐糖能障害を抑制する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本善隆、岡村拓郎、濱口真英、福井道明
2. 発表標題 2型自然リンパ球は内臓脂肪の飽和脂肪酸吸収の制御を介し糖代謝を改善する
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本善隆、岡村拓郎、間嶋紗織、千丸貴史、牛込恵美、中西尚子、浅野麻衣、瀧口真英、山崎真裕、高桑裕史、福井道明
2. 発表標題 腸内殺菌モデルマウスにおけるDysbiosisとそれに伴う代謝障害メカニズムの解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
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

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