

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22646

研究課題名(和文) インスリンによる抗菌ペプチド産生・分泌を介した新たな腸内細菌制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of intestinal bacterial regulation via insulin-mediated production and secretion of antimicrobial peptides

研究代表者

竹見 祥大 (Takemi, Shota)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：70871440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、小腸の陰窩に位置するPaneth細胞が分泌する抗菌ペプチドおよびタンパク質の新たな産生・分泌制御機構を探索することを目的とした。これまでの研究代表者の実験から、インスリンがそれに関与するとの仮説をたて研究を行った。その結果、マウスへのインスリンの投与によって、Lysozyme (Paneth細胞から分泌される抗菌タンパク質)の染色性が減少した。加えて、マウス小腸から作製したオルガノイドへインスリンを処理したところ、Paneth細胞からの小胞の分泌が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、小腸の抗菌ペプチド及びタンパク質の新たな産生・分泌制御機構を明らかにした。これまでインスリンの生理作用に関する研究は代謝関連が主であり、本研究で明らかにしたインスリンによる抗菌物質の産生・分泌の増加という現象は学術的にユニークである。インスリンは食後に血中濃度が上昇するホルモンであるため、本研究で明らかにした抗菌物質の分泌制御機構は、食後の抗菌及びその破綻の結果としての疾患と関連していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to explore a new regulatory mechanism for the production and secretion of antimicrobial peptides and proteins secreted by Paneth cells located in the crypts of the small intestine. Based on my previous experiments, I hypothesized that insulin is involved in the process. Insulin administration to mice decreased the staining intensity of lysozyme (an antimicrobial protein secreted by Paneth cells). In addition, treatment of organoids prepared from mouse small intestine with insulin resulted in secretion of vesicles from Paneth cells.

研究分野：腸内生理学

キーワード：Paneth細胞 抗菌ペプチド及びタンパク質

1. 研究開始当初の背景

私たちの腸管粘膜は、食べ物に含まれる細菌やウイルスなどの異物に常にさらされている。小腸上皮の陰窩底部に位置するパネート細胞は α -defensin や Lysozyme などの抗菌ペプチド及び蛋白質 (Antimicrobial peptides and proteins: AMPs) を産生し、異物を排除する。AMPs は、病原菌の排除と腸内細菌との共生を制御すると考えられており、AMPs の分泌異常は腸内共生細菌叢の構成異常 (Dysbiosis) を引き起こす。Dysbiosis は肥満、炎症性腸疾患、2 型糖尿病など多くの疾患の発症リスクや症状を促進する要因と考えられてきているため、多分野にわたる疾病の克服のためには腸内細菌叢を制御する AMPs 産生・分泌機構を解明することが重要である。

これまでの AMPs の産生制御については、微生物を認識するパターン認識受容体 (pattern recognition receptors; PRRs) に関する報告が多く、他の因子による AMPs 産生制御機構については不明な点が多く残っている。研究代表者はこれまでの研究から、いくつかの腸内 AMPs の発現が食餌によって上昇することを発見した。そこから着想し、食べ物とともに体内に侵入してくる病原菌に備えるために、PRRs による AMPs 産生の促進とは別に、食後に血中濃度が上昇するインスリンが AMPs 産生・分泌に寄与するのではないかと考えた。実際、パネート細胞にはインスリン受容体が発現していること、インスリン分泌不全マウスには Dysbiosis が起きていることが報告されている。以上の知見から AMPs 産生におけるインスリンの関与が考えられるが、これまでインスリンがパネート細胞に発現するインスリン受容体に直接作用して AMPs 発現を上昇させ、腸における抗菌に寄与するかは明らかではない。

2. 研究の目的

食後に血中レベルが上昇するインスリンはパネート細胞に発現するインスリン受容体を介して、AMPs の産生・分泌を上昇させ、食餌とともに腸管に入ってきた有害な細菌の除去と Dysbiosis の抑制に寄与していると仮説を立て、その機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

【実験】インスリン/インスリン受容体拮抗薬の投与

インスリンが小腸における AMPs 産生を増加させるか明らかにするために、マウスにインスリンを投与した後、及び摂食後の AMPs mRNA 発現量を定量 PCR 法で測定した。また内因性のインスリンシグナリングを阻害し AMPs 産生が減少するか調べるために、インスリン受容体拮抗薬 (S961) の食前投与を行い、食後の AMPs mRNA 発現量を測定した。さらに、摂食後、インスリン投与後のパネート細胞内 Lysozyme 含有量を測定するため、Lysozyme の免疫組織化学染色を行った。

【実験】マウス十二指腸オルガノイドを用いたインスリンによる小胞分泌の経時観察

インスリンがパネート細胞の小胞分泌を促進するメカニズムを明らかにするため、マウス十二指腸からオルガノイドを作製し、インスリンによって小胞分泌が起きるか観察した。またその

際の細胞内カルシウムイオンの関与を検討した。

【実験】インスリンシグナリング機能不全マウスの作製

Tamoxifen の投与により任意の時期に Cre リコンビナーゼを活性化できる CreERT2 をパネート細胞に発現するマウスを作製し、パネート細胞特異的にインスリンシグナリングを阻害した際に、腸及び全身の生理状態がどのように変化するか観察することを目的とした。パネート細胞で特異的に発現することが報告されている Zfp667 遺伝子をターゲットとし、その遺伝子座に CreERT2 配列を挿入したマウスの作製を群馬大学生体調節研究所の畑田博士のグループに依頼した。作製した Zfp667-CreERT2 マウスと、購入可能である flox-Insulin receptor マウスと交配し、任意の時期にインスリン受容体をパネート細胞特異的にノックアウトできるマウスを作製する。

4. 研究成果

【実験の結果】

マウス十二指腸において、*Lysozyme1* と *Defa1* の mRNA 発現量が摂食後 2 時間で上昇し、*Reg3g* mRNA 発現量は摂食後 1 時間で上昇した。インスリン投与 2 時間後には *Lysozyme1* mRNA 発現が有意に上昇した。一方で、S961 の食前投与を行った結果、摂食 2 時間後の *Lysozyme1* と *Defa1* の mRNA 発現量は有意に減少した。インスリン投与 1 時間後のマウス十二指腸の蛍光免疫染色の結果、インスリン投与によって蛍光強度や蛍光が見られた細胞内領域は有意に減少した。以上の結果から、インスリンは十二指腸のパネート細胞に働きかけ、1 時間程度で細胞内に貯蓄してある小胞を管腔へと分泌し、その後 AMPs が含まれる小胞を細胞内に再貯蓄するために *Lysozyme* や *Defa* の mRNA 合成を促進することが考えられた。以上の研究成果は、第 45 回日本比較内分泌学会大会（2021 年 11 月 12 日-14 日）で発表した。

【実験の結果】

マウス十二指腸から安定してオルガノイドを作製することに成功した。オルガノイドに含まれるパネート細胞の小胞を共焦点レーザー顕微鏡下で経時観察する実験系を構築し、カルバコールによって小胞が分泌される様子を観察できた。同様に、インスリン処理によって小胞の分泌が促進されることを明らかにした。さらに、カルシウム流入を阻害する SKF96365 存在下でのインスリン処理は、パネート細胞の小胞分泌を促進しなかったことから、インスリンによる小胞分泌にはカルシウムイオンの関与が示唆された。

【実験の結果】

群馬大学生体調節研究所の畑田出穂博士のグループから Zfp667-CreERT2 マウスの founder を 4 匹供与していただいた。現在はこれらのマウスを C57BL/6J マウスと back-cross している。すでに F2 マウスまでは問題なく交配できている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嶋田智紀、河野雄真、松崎賢寿、中林誠一郎、吉川洋史、坂田一郎、竹見祥大
2. 発表標題 マウス小腸での摂食後抗菌ペプチド産生・分泌制御機構の検討
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
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
研究協力者	松崎 賢寿 (Matsuzaki Takahisa)		

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