

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26460392  
研究課題名(和文) 腸管における新たなインスリン作用の研究

研究課題名(英文) The new function of insulin in gut.

## 研究代表者

吉澤 達也 (Yoshizawa, Tatsuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：40313530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管は糖代謝に重要な組織であるが、腸管へのインスリン作用については明らかではない。そこで申請者らは、腸管上皮細胞特異的インスリン受容体ノックアウト(IR gutCKO)マウスを作製し、糖代謝への影響を解析した。糖負荷試験ではIR gutCKOマウスに耐糖能異常が現れた。さらに、腸管において免疫反応に関わる遺伝子群の発現が数多く変化し、腸内フローラが変化していた。以上の結果から、腸管のインスリンシグナルは免疫系へ働きかけ、腸内フローラを変化させることで、糖代謝を制御している可能性が示唆された。また、腸管は高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性を引き起こしにくい臓器であることも判明した。

研究成果の概要(英文)：Gut is the tissue that is important to glucose metabolism, but it is not clear about the insulin action to gut. Therefore applicants generated the gut-specific insulin receptor knockout (IR gutCKO) mice and analyzed influence on glucose metabolism. The IR gutCKO mice showed impaired glucose tolerance in the glucose tolerance test. In addition, expressions of many genes concerned with immunoreaction were changed in the gut of the IR gutCKO mice, and intestinal flora was changed in the IR gutCKO mice. These results indicate that an enteric insulin signal modulate immune system and change intestinal flora, thereby controlling glucose metabolism. Furthermore, it was shown that gut was the organ, which is hard to cause high fat diet-induced insulin resistance.

研究分野：基礎医学

キーワード：インスリン 糖代謝 腸管

### 1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病や肥満といった生活習慣病が世界中で急増しており、その成因解明と治療法の開発は重要である。糖代謝において中心的な役割を担っているのは、膵臓で合成・分泌されるインスリンである。通常、インスリンは血糖値上昇により分泌され、肝臓・筋肉・脂肪などの末梢組織に作用する事で血糖値を低下させるが、糖尿病患者では、このインスリン分泌の障害や末梢組織でのインスリン作用の低下（インスリン抵抗性）が重要な原因として認められる。特に、後者は糖尿病のみならず高脂血症・高血圧・動脈硬化にも関与しており、その改善は重要かつ必須な課題である。

Dr. C.R. Kahn らは、各末梢組織特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを数多く作製・解析し、末梢組織におけるインスリン作用を個体レベルで再確認もしくは再評価してきた。そして、教科書的に重要とされているインスリン標的組織の解析は、全て終了したように思えた。

しかし申請者らが、骨組織におけるインスリン作用の解明を目的とし、骨芽細胞特異的インスリン受容体ノックアウトマウスを作製・解析したところ、驚くべき事に骨芽細胞におけるインスリン作用が糖・エネルギー代謝に非常に重要である事が明らかとなった (Ferron, M. \*, Wei, J. \*, Yoshizawa, T. \* et al, *Cell* 142(2): 296-308, 2010.)。この研究により、骨芽細胞が糖・エネルギー代謝に重要なインスリン標的細胞である事が明らかになっただけでなく、他にも今まで注目されていなかった組織が実は重要なインスリン標的組織であるという可能性が生じた。

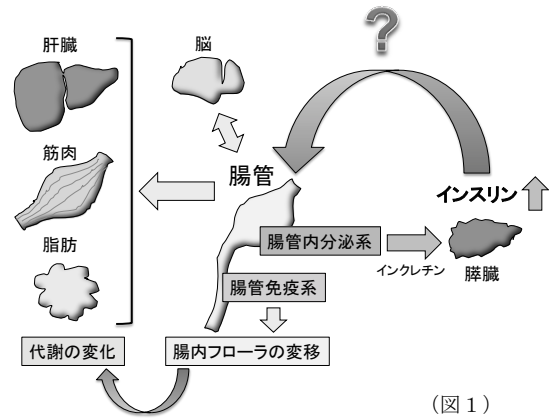
### 2. 研究の目的

腸管は外から受けた刺激（栄養素、毒素、細菌等）に反応し、生体の代表的な制御システムである神経系、免疫系、内分泌系のシグナル伝達経路がクロストークしながら、生体全体の恒常性を保とうとしている（図1）。特に近年では、腸管による代謝調節に注目が集まっている。例えば、腸管由来ホルモン・インクレチンは、口から摂取した糖や脂質に反応して分泌され、血流を介して膵臓のβ細胞からのインスリン分泌を促進させる（腸管内分泌系）。最近では、腸管免疫系の変化による腸内細菌叢（腸内フローラ）の変移と生活習慣病との関連についても続々と報告されており、腸管は代謝調節に非常に重要な臓器であることが明らかにされつつある。

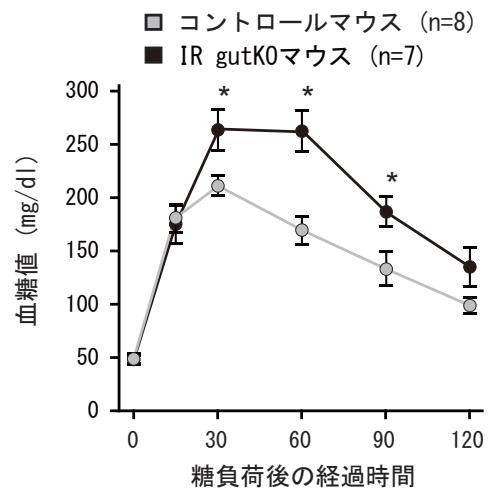
ところが、腸管におけるインスリン作用についてはほとんど分かっておらず、一般的には生活習慣病において腸管のインスリン抵抗性が言及されることは無い。

そこで申請者は、糖・エネルギー代謝に重要な新たなインスリン標的組織の発見のため、近年、代謝調節に非常に重要な臓器であることが明らかにされつつある「腸管」に焦点を当て、その組織特異的なインスリン作用の解明を試みている。

すでに申請者は、腸管特異的インスリン受容体ノックアウト（IR gutKO）マウスを作製・解析し、耐糖能異常が現れることを発見しており（図2：未発表データ）、糖・エネルギー代謝における腸管へのインスリン作用の重要性と、今後の詳細な解析の必要性を強く確信していた。



(図1)



(図2：経口糖負荷試験)

### 3. 研究の方法

IR gutKO マウスを作製し、腸管へのインスリン作用について解析する。申請者が現在までに行った解析により、腸管におけるインスリンシグナルが、1) 糖・エネルギー代謝を

制御すること、2) 腸管免疫系を制御する可能性があること、が明らかとなったため、その分子メカニズムについて重点を置いて解析を進める。また、糖尿病・肥満モデルマウスを用いて、腸管のインスリン抵抗性がどのような病態でいつ引き起こされるのか、またそのメカニズムについて検討する。

#### (1) 腸管におけるインスリン標的遺伝子群の解析

腸管におけるインスリンの標的遺伝子を明らかにするため、IR gutKO マウスとコントロールマウスの腸管を回収し、DNA マイクロアレイ法にて発現の異なる遺伝子群を網羅的に解析した。その後、qPCR 法にて定量的に遺伝子発現の差異を再確認した。

#### (2) IR gutKO マウスを用いた腸内細菌叢(腸内フローラ)の解析

最近では、腸管免疫系の変化による腸内フローラの変移と生活習慣病との関連についても続々と報告されており、腸管は代謝調節に非常に重要な臓器であることが明らかにされつつある。そこで、IR gutKO マウスの糞を用いて腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子をリアルタイム PCR 法で解析、さらに次世代シーケンサーによるメタゲノム解析で腸内フローラを網羅的に解析した。腸内フローラの解析は、腸内細菌研究のエキスパートである福田真嗣准教授(慶應義塾大学先端生命科学研究所)に研究協力して頂いた。

#### (3) IR gutKO マウスを用いた糖・エネルギー代謝の解析

IR gutKO マウスで見られた耐糖能異常が腸内細菌叢の変化によるものか否かを判断するため、IR gutKO マウスに4種混合抗生物質を4週間与え、腸内細菌を死滅させた状態で、経口耐糖能試験(OGTT)を行なった。

#### (4) 腸管のインスリン抵抗性に関する解析

一般に「インスリン抵抗性」は、血糖値を指標にした個体全体としてのインスリン感受性の低下について使われる。しかし、実際には各組織において異なった時期とメカニズムでインスリン抵抗性は引き起こされ、異なった機能異常を及ぼすので、生活習慣病の全体像を解明するためには、それぞれの末梢組織において特異的なインスリン作用と、組織ごとに引き起こされる特異的なインスリン抵抗性(選択的インスリン抵抗性)発症メカニズムの検討が必須である。

そこで、腸管でインスリン抵抗性が引き起こされる仕組みを調べる為、高脂肪食負荷マウスを経時的に解析し、各臓器でのインスリン抵抗性がどのようなタイミングで引き起こされるのかについて解析した。

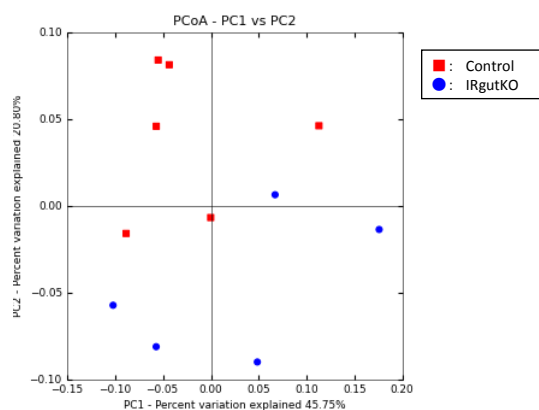
#### 4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析の結果、腸管特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの十二指腸において免疫反応に関わる遺伝子群が数多く変化していた。これは腸管におけるインスリンシグナルが腸管免疫系を調節していることを示唆するものである。特に、自然免疫に関連する遺伝子群(Immunoglobulin 関連、Defensin 関連、Reg ファミリー、Phospholipase A2 等)が多く変化していたことから、腸管のパイエル板やパネート細胞に変異がある可能性が示唆された。

qPCR 法にて定量的に遺伝子発現の差異を再確認したところ、Defensin 関連、Reg ファミリー、について再確認が取れた。

これらの遺伝子発現変化が、インスリンの直接作用なのか、腸内細菌などを介した間接作用であるか、今後の詳細な解析が期待される。

(2) IR gutKO マウスの糞を用いて腸内フローラの解析を行った結果、IR gutKO マウスとコントロールマウスでは、腸内フローラが異なることが明らかとなった(図3:未発表)。



(図3: Unifrac analysis, Weighted

(腸内細菌の種類に菌数の情報を加えたもの。腸内細菌叢の構造情報に基づく主座標分析))

特に、IR gutKO マウスにおいて、クロストリジウム属のクラスターXIVaやIVなどで

は顕著な増加を示し、乳酸菌のいくつかの属では有意に低下していた。

(3) IR gutKO マウスに4種混合抗生物質を4週間与え、腸内細菌を死滅させた状態で、経口耐糖能試験 (OGTT) を行なった結果、IR gutKO マウスとコントロールマウスとの間で有意な差が認められなくなった。

したがって、IR gutKO マウスで見られた耐糖能異常は、腸内細菌叢の変化によるものと考えられた。

(4) 腸管でインスリン抵抗性が引き起こされる機構を解析するため、マウスを高脂肪食負荷し、インスリンによるシグナル伝達分子のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、筋肉や脂肪、肝臓でインスリン抵抗性が引き起こされる時間軸では腸管のインスリン抵抗性は引き起こされないが、さらに長い期間高脂肪食負荷を続けることで腸管でもインスリン抵抗性が引き起こされることが明らかとなった。

今後は、なぜ腸管においてインスリン抵抗性が起きにくいのか、その分子機構を解析する予定である。

#### (5) まとめ

最終年度は、4月に発生した熊本大地震により研究機器が壊滅的打撃を受けたばかりか、ノックアウトマウスのラインが絶滅寸前まで減少したこともあり、予定より研究が大幅に遅れ、最終的に研究を完了することができなかった。現在新たなマウスを導入し、実験を再開しつつあり、今後研究を完了させ論文に発表する予定である。

現在までの結果からは、腸管のインスリンシグナルは免疫系へ働きかけ、腸内フローラを変化させることで、糖代謝を制御している可能性が示唆された。また、腸管は高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性を引き起こしにくい臓器であることも判明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 達也 (Yoshizawa Tatsuya)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：40313530

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：