

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15488

研究課題名(和文)腸内細菌・組織マクロファージ関連メカニズム解明による抗糖尿病療法の開発

研究課題名(英文)Development of anti-diabetic therapy by the elucidation of the mechanism linking microflora and adipose tissue macrophages

研究代表者

植木 浩二郎(Ueki, Kohjiro)

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：00396714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：摂食後に腸内細菌由来のLPSとインスリンにより、脂肪組織のマクロファージでIL-10の産生が誘導されることを見いだした。マクロファージ特異的Akt1/Akt2ノックアウト(MAktDKO)マウスの解析から、IL-10の産生は、Akt-mTORC1経路の活性化によるものと考えられた。MAktDKOマウスでは、摂食後のIL-10の誘導が低下されており、糖新生の抑制が障害されており、耐糖能障害がみられた。MAktDKOマウスにアデノウイルスでIL-10を過剰発現すると、上記の糖代謝障害が改善した。また、MAktDKOマウスでは、通常食下で脂肪組織や肝臓での脂肪酸合成が上昇しており、肥満が認められた。

研究成果の概要(英文)：We have found that LPS derived from microflora and insulin induced by feeding stimulates the production of IL-10 in adipose tissue macrophages, and that this production depends on the Akt-mTORC1 pathway. Indeed, mice with disruption of Akt1 and Akt2 specifically in macrophage (MAktDKO mice) show impaired production of IL-10. MAktDKO mice exhibit impaired glucose tolerance with increased hepatic gluconeogenesis. Adenovirus-mediated gene transfer of IL-10 improves glucose tolerance with decreased hepatic gluconeogenesis in MAktDKO mice. Furthermore, MAktDKO mice show more weight gain under the normal chow diet compared to the control mice.

研究分野：糖尿病代謝内科学

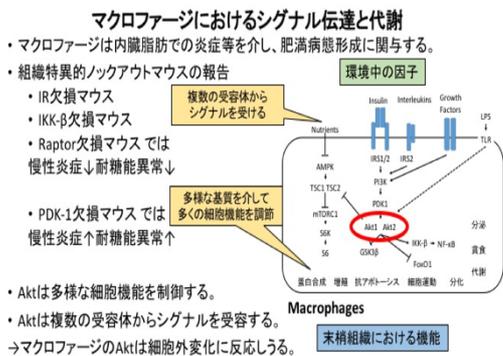
キーワード：Akt マクロファージ インスリン LPS

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満によるインスリン抵抗性の形成に脂肪組織における炎症性マクロファージ(M1 マクロファージ)の集積と炎症性サイトカインの分泌亢進などの活性化が、重要な働きをしていることが我々 (Kamei et al. JBC 2006, Nishimura Nat Med 2009, Kobayashi et al. PNAS 2011) および他の研究者によって明らかにされてきている。実際、マクロファージの遊走に必須であるPI3K $\gamma$ をノックアウトしたマウスでは、肥満をさせても脂肪組織や肝臓へのマクロファージの集積が起こらず、インスリン抵抗性が著しく、抑制される。一方、脂肪細胞特異的にMCP-1を高発現させたマウスでは、脂肪組織へのマクロファージの集積増加とインスリン抵抗性の増強が認められる。一方、非肥満の状態でも脂肪組織の在来マクロファージの大部分を占める抗炎症性マクロファージ(M2 マクロファージ)は、IL-10等の抗炎症性サイトカインを分泌し、インスリン感受性を高める作用を有しているのみならず、最近ではエネルギー代謝や白色脂肪細胞の褐色化(browning)にも関与していると言われるようになってきた。一方で、高脂肪食や肥満では、腸内細菌叢の変化がそれらが分泌する因子や代謝産物の作用によって、インスリン抵抗性やNASHなどの肥満関連疾患の成因に関与する、あるいは特定の腸内細菌叢が肥満を助長する、などのヒトやマウスでのデータも集積されつつある。しかしながら、これらがどのように関係しているのかは明らかにされていない。

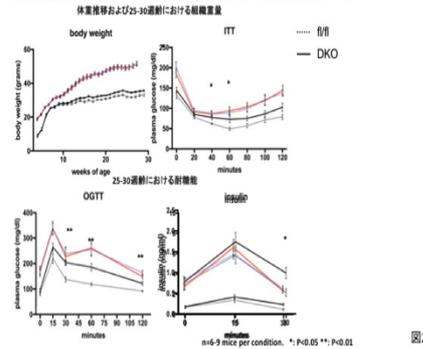
2. 研究の目的

我々は、マクロファージにおいてインスリンやケモカイン・サイトカインシグナルの下流に位置し、マクロファージの様々な作用に重要な役割を果たしていると考えられるAktの2つの主要なアイソフォームAkt1およびAkt2をマクロファージ特異的に欠失したMAktDKOマウスを作成している(図1)。このマウスは、通常食飼育下で野生型に比べ、体重・肝重量・脂肪重量が増加



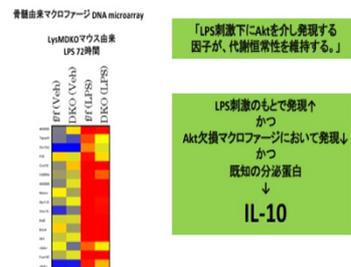
しておりインスリン抵抗性・耐糖能障害が認められる(図2)。また、このMAktDKOマウスでは、LPS刺激による炎症終止シグナルをになうIL-10の産生が有意に抑制さ

通常食摂取下のLysMDKOマウスはインスリン抵抗性となり、高脂肪食摂取下では対照と同等の肥満を示した



れていた(図3)。In vitroでは、IL-10を脂肪細胞に添加すると、脂肪蓄積が抑制された。これらのことから、腸内細菌から分泌されるLPSなどの何らかの因子が脂肪組織マクロファージを刺激して、IL-10の分泌を促し、インスリン感受性や体重を維持しているという機構が想定される。本研究では、上記の仮説に基づき、このような生体恒常性をになっている腸内細菌叢や、その脂肪組織マクロファージとの連関のメカニズムとして腸内細菌叢からの刺激を受けたマクロファージの脂肪組織・肝臓への作用機構、ことにIL-10の産生調節機構とその作用メカニズムを明らかにする。

LPS刺激下でのマクロファージ由来因子の探索



3. 研究の方法

- IL-10等による脂肪重量・肝重量増加抑制のメカニズム解明
  - 野生型およびMAktDKOマウスの通常食飼育下および高脂肪食飼育下での脂肪組織・肝臓などでの脂肪酸合成経路・脂肪酸燃焼経路・褐色脂肪化マーカーの発現や視床下部の食欲エネルギー消費調整因子発現とIL-10発現の関係を検討する。
  - 野生型およびMAktDKOマウスにアデノウイルスによりIL-10を高発現させた際の、脂肪組織・肝臓などでの脂肪酸合成経路・脂肪酸燃焼経路・褐色脂肪化マーカーの発現や視床下部の食欲エネルギー消費調整因子発現などを検討する。
- マクロファージAkt活性化によるIL-10産生メカニズムの解明

- (1) 野生型および MAktDKO マウスの通常食飼育下および高脂肪食飼育下での脂肪組織マクロファージにおける Akt の活性化、IL-10 の産生を免疫染色および FACS により解析する。
- (2) 野生型および MAktDKO マウスの骨髄から単離したマクロファージで、LPS およびインスリン刺激による IL-10 産生を検討し、野生型マクロファージについては PI3K インヒビター、mTORC1 インヒビター、活性型 GSK3、活性型 FoxO1 を投与して IL-10 産生能に対する影響を検討する。
- ③組織マクロファージにおいて IL-10 等の産生を亢進させる腸内細菌の同定
- (1) 野生型および MAktDKO マウスにおいてバンコマイシン等の抗生剤投与で変化する細菌から、食事誘導性にマクロファージの Akt を活性化させる菌叢を同定する。

#### 4. 研究成果

##### ① IL-10 等による脂肪重量・肝重量増加抑制のメカニズム解明

- (1) 通常食飼育下では、MAktDKO マウスの肝臓では、野生型マウスに比して、脂肪組織では脂肪分化経路や脂肪酸合成経路の遺伝子発現が上昇していた。また、肝臓での糖新生経路の遺伝子発現が上昇していた。また、脂肪酸合成経路の遺伝子の上昇が認められた。高脂肪食飼育下では野生型と MAktDKO マウスでの違いはなかった。これは、高脂肪食下では、通常食下で食事によって誘導されるマクロファージの Akt 活性化が野生型でも消失しているためと考えられた。
- (2) IL-10 をアデノウイルスで MAktDKO マウスの肝臓に発現させると、通常食下では、肝臓での糖新生の抑制や脂肪酸合成経路遺伝子の発現上昇の抑制が生じていた (図 4)。

アデノウイルスを用いたIL-10強制発現により肝糖新生関連遺伝子発現が低下した

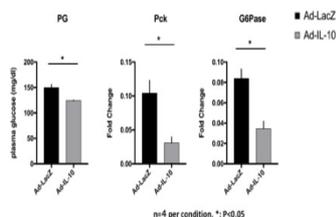


図4

##### ③ マクロファージ Akt 活性化による IL-10 産生メカニズムの解明

- (1) 野生型マウスでは、通常食下では摂食後に脂肪組織の F4/80 陽性細胞に Akt の活性化が免疫染色で認められた。FACS 解析では IL-10 の増加も認めら

れた。このような変化は MAktDKO マウスでは消失していた。

- (2) 野生型マウスの骨髄から単離したマクロファージで、LPS 刺激によって IL-10 産生が増強し、またインスリンと同時に刺激するとその産生が極めて急速に起きることが分かった。このような IL-10 の誘導はインスリンの単独刺激では起こらなかった。MAktDKO マウス由来のマクロファージでは、インスリンと LPS 共刺激による IL-10 の産生は著明に抑制されていた。また、野生型マクロファージでは、IL-10 の産生は、PI3K インヒビターで抑制された。また、MAktDKO にさらにマクロファージ特異的 FoXO1 のノックアウトを家系合わせたマウスの骨髄から単離したマクロファージでも、IL-10 の産生は抑制されたままだった。一方、TSC2 のノックアウトで mTORC1 を活性化させると IL-10 の産生が野生型と同様に回復した (図 5)。

LysMCre Akt1/Akt2/TSC2 floxed (LysMDKOT) マウスではマクロファージのIL-10発現、摂食による糖新生抑制が回復した

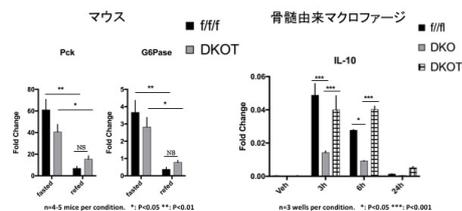


図5

##### ③組織マクロファージにおいて IL-10 等の産生を亢進させる腸内細菌の同定

MAktDKO マウスにおいてバンコマイシン等の抗生剤を投与すると、糖代謝が改善した。これは、LPS 等を産生するグラム陰性菌が有意になったためではないかと考え、その同定を進めている。

#### 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 1 件)

戸田郷太郎、「骨髄系細胞における Akt を介した代謝恒常性維持機構の検討、第 59 回日本糖尿病学会、平成 28 年 5 月 20 日 京都国際会議場 (京都府・京都市)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

植木浩二郎 (Ueki, Kohjiro)

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：00396714