

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06460

研究課題名（和文）膜様条虫の寄生が糖尿病モデルマウスの高血糖を正常化する分子機構の基盤的解析

研究課題名（英文）Basic analysis of mechanism on normalization of hyperglycemia in diabetic model mice by intestinal tapeworm

研究代表者

大野 民生（Ohno, Tamio）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90293620

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病モデルマウスに膜様条虫（*Hymenolepis microstoma*: Hm）を感染させると高血糖が正常化する現象を見出したが、その機構は不明である。本研究ではインクレチン（GLP1）と短鎖脂肪酸に着目しHmの高血糖正常化機構の解析をおこなった。その結果、短鎖脂肪酸やそれを産生する腸内細菌は関与していないが、GLP1シグナルの活性化が高血糖の正常化に関与している事を明らかにした。一方で、それ以外の高血糖正常化因子の存在が示唆され、その1つとしてHm感染が肝障害を誘発する事が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、寄生蠕虫の宿主への免疫修飾作用を応用した蠕虫療法が着目されている。本研究では膜様条虫は免疫系とは関係なくGLP1シグナルを介してマウスの高血糖を正常化させる作用がある事を明らかにした。GLP1分泌を促進する膜様条虫の虫体や虫体分泌物が判明すれば、糖尿病治療薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Infection of diabetic mouse models with intestinal tapeworm (*Hymenolepis microstoma*: Hm) normalizes hyperglycemia, but the mechanism is unknown. In this study, we focused on incretin (GLP1) and short-chain fatty acids. The results revealed that activation of GLP1 signaling is involved in the normalization of hyperglycemia, although short-chain fatty acids and the intestinal bacteria that produce them are not involved. On the other hand, it was suggested that there are other factors that normalize hyperglycemia. One of the possible factors was that Hm infection induced liver damage in mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：膜様条虫 糖尿病マウス GLP1 短鎖脂肪酸 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

(1) 寄生虫には単細胞生物の原虫と多細胞生物の蠕虫が存在する。蠕虫の感染は宿主の Th2 細胞や制御性 T 細胞 (Treg) を活性化する一方で、Th1 細胞や Th17 細胞の働きを抑制するという特徴的な免疫修飾(調節)作用を有する(*Front Immunol*, 8:453, 2017)。そのため、自己免疫疾患やアレルギー疾患等の Th1 細胞や Th17 細胞の活性化が病態形成に関係する疾患の治療法として蠕虫が注目され、盛んに基礎研究が行われている(*Trends Parasitol*, 35:501, 2019)。また、一部の炎症性疾患に対しては寄生蠕虫療法の臨床試験も実施されている(*Parasite Immunol*, 39:e12407, 2017)。更に、近年では肥満や動脈硬化等の生活習慣病においても Th1 細胞の活性化を伴う慢性炎症の関与が認識されるようになり、生活習慣病に対する寄生蠕虫療法の基礎研究も展開され始めている (*Trends Parasitol*, 33:694, 2017)。しかし、代表的な生活習慣病である肥満型糖尿病については、疫学的調査において蠕虫感染の改善効果が示唆されている(*Parasite Immunol*, 39:e12404, 2017)が、マウスを用いた解析ではその効果は小さく高血糖状態が完全に正常化するという報告はない。

(2) 研究代表者は肥満を伴い慢性的な高血糖を自然発症する KK-*A^y* 系統に蠕虫の一種であるマウスの膜様条虫 (*Hymenolepis microstoma: H.m.*) を感染させると、この条虫が腸管内で成虫(サナダ虫)となる感染 2 週間後には、肥満は解消されないが血糖値が正常化する事を見出した。同様の血糖降下作用は、膵臓 細胞を特異的に障害して高血糖を誘発させるストレプトゾトシン (STZ) を投与した C57BL/6J (B6J) に *H.m.* を感染させた場合にも認められた。*H.m.* 感染による高血糖の正常化は重度免疫不全 (SCID) マウスにも認められる事や、*H.m.* 感染により血糖値が正常化したマウスの血中インスリンが上昇する事から、膜様条虫は宿主の免疫修飾(調節)作用を介さずにインスリン分泌を促進して高血糖を正常化していると考えられるが、その機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では *H.m.* 感染時に高血糖を正常化させる機構の解明を目的とした。具体的には、GLP1 (glucagon like peptide 1) と短鎖脂肪酸を膜様条虫の高血糖正常化現象に関与する重要な候補分子と考え、これら分子の関与について遺伝子改変マウスを用いて解析した。GLP1 は血糖値依存的なインスリン分泌作用に加えグルカゴン分泌抑制や筋肉での糖取込促進など強い高血糖改善作用を有する消化管ホルモンである (*Nat Rev Endocrinol*, 14:390, 2018)。実際、研究代表者の解析では *H.m.* 感染個体の血中 GLP1 濃度は非感染個体の約 10 倍を示していた。糖、脂質、アミノ酸等の腸管内の多様な物質が GLP1 の分泌刺激となる事が知られており (*J Diabetes*, 8:753, 2016)、条虫分泌排泄抗原等が GLP1 分泌を促進している可能性が考えられた。一方、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は、GLP1 やインスリンの分泌を促進して糖尿病に改善効果がある事 (*Mediators Inflamm*, 162021, 2014) や、一部の腸管内寄生蠕虫は腸内細菌叢を変化させ短鎖脂肪酸産生を増加させる事 (*Mucosal Immunol*, 11:1039, 2018) から、これも重要な候補分子と考えられた。本研究では特に GLP1 と短鎖脂肪酸に着目して、*H.m.* 感染による高血糖の正常化機構の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス: 本研究に使用したマウスは、名古屋大学大学院医学系研究科・実験動物部門の SPF 飼育室(温度:23、湿度:55%、照明:12L12D)で飼育した。使用したマウス C57BL/6J (B6J) 系統と NSY 系統は日本 SLC 社から購入した。本研究は名古屋大学医学系研究科動物実験委員会と名古屋大学医学系研究科組換え DNA 実験安全委員会の承認下で実施した。また、膜様条虫の維持とマウスへの感染実験は、実験動物部門内の ABSL2 (Animal Bio-Safety Level 2) 区域内で実施した。

(2) GLP1 の関与についての解析: NSY-*A^y* マウスの作製: NSY 系統に B6J-*A^y* 系統由来の *A^y* と *Tyr⁺* アレルを 10 回戻し交配して導入したコンジェニック系統 (NSY-*A^y* 系統) を樹立した。この系統は顕著な肥満と高血糖を示す新規 2 型糖尿病モデルとしての特徴を備えていた。なお、*A^y* アレルのホモ型個体は胎生致死となるため、本系統は *A^y* アレルを持つ個体 (*A^y/a*: 肥満高血糖を示す) と持たない個体

(*a/a*: 肥満高血糖を示さない)の分離型近交系として維持されている。本研究では肥満高血糖を示す *A^y/a* 個体のみを解析に用いた。GLP1R・KO マウスの作製: GLP1 はグルカゴン遺伝子から転写翻訳された前駆体タンパク質がプロセシングを受けて産生される多種のタンパク質のうちの1つであるため、GLP1だけを欠損させる事は難しい。一方、その受容体はGLP1Rのみであるため、*Glp1r* 遺伝子欠損マウスを用いてGLP1の関与を解析した。GLP1Rは7回膜貫通型の受容体であるため、最初の膜貫通部位をコードするエクソン4とエクソン5の両端に2種のgRNAを設計しCas9タンパク質をB6J系統とNSY-*A^y*系統の受精卵に導入した。生まれたマウスのオン・オフターゲット候補の塩基配列をサンガー法で確認し、オフターゲット変異を持たずエクソン4とエクソン5を欠失したヘテロKO個体をファウンダーとしてB6J系統とNSY-*A^y*系統を遺伝背景等する2系統のGLP1R・KOマウスを樹立した。正常マウス(B6J, B6J-*Glp1r*・KO)へのSTZ投与による高血糖の誘発:5週齢の雄マウスに4.5時間絶食させてから腹腔内に95mg/kgBWの割合でストレプトゾチン(STZ)を2日連続投与した。投与2週間後に200mg/dl以上の血糖値を示した個体を使用した。*H.m.*感染:研究代表者は*H.m.*の終宿主(マウス)と中間宿主(穀象虫)を用いてラボ内で本条虫の生活環を維持している。本研究では*H.m.*に感染した中間宿主から実体顕微鏡下で感染型幼虫(擬嚢尾虫)を取り出し、経口ゾンデを用いて7週齢の雄マウスに5虫/匹の割合で経口感染させた。ただし、高血糖を自然発症するNSY-*A^y*とNSY-*A^y*-*Glp1r*・KOマウスについては全個体が高血糖を発症する12週齢の雄マウスに5虫/匹の割合で*H.m.*を経口感染させた。

(3)腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸及び腸内細菌の関与についての解析: 東京農工大・木村郁夫先生が作製した短鎖脂肪酸受容体(FFAR2)欠損マウスの提供を受け、上述(2)の方法でSTZを投与して高血糖を誘発させた後、*H.m.*を5虫/匹の割合で感染させて血糖値の推移を観察した。B6J系統に上述(2)の方法でSTZを投与して高血糖を誘発させ7週齢で*H.m.*を感染させた後、8週齢から2週間にわたり抗生物質のカクテル(アンピシリン、ネオマイシン:1.0g/L、バンコマイシン、ゲンタマイシン:0.5g/L、人工甘味料:20g/L)を飲水として与えて腸内細菌を激減させた群と与えなかった群で血糖値の変化を比較した。

4. 研究成果

(1)B6J系統とゲノム編集技術で作製したB6J-*Glp1r*・KO系統について、STZ投与により高血糖を誘発し*H.m.*を感染させたところ、両系統とも血糖値が劇的に低下した。しかし、B6JよりB6J-*Glp1r*・KOの方が低下率は低かった(図1)。次に、本研究で樹立した高血糖を自然発症するNSY-*A^y*系統と、この系統にゲノム編集で*Glp1r*遺伝子の欠失変異を導入したNSY-*A^y*-*Glp1r*・KO系統で同様の実験を行った。先の結果と同様に、両系統とも*H.m.*感染後に血糖値が劇的に低下したが、その割合はNSY-*A^y*-*Glp1r*・KOの方がNSY-*A^y*より小さかった(図2)。なお、マウスから取り出した*H.m.*の寄生虫体数や虫体総重量と血糖値の降下幅には全く相関がなく、*H.m.*が寄生していれば血糖値が低下した。

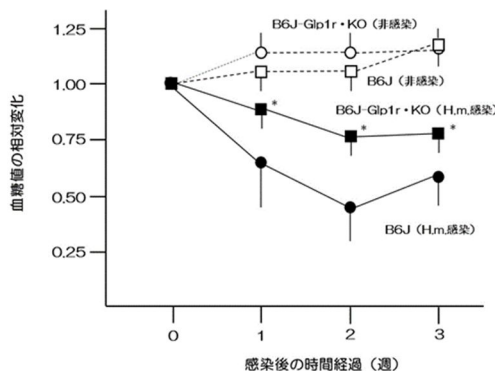


図1 STZ投与で高血糖を発症した2種のマウス系統 (B6J, B6J-*Glp1r*・KO) における *H.m.*感染群と非感染群の血糖値の変化
*) B6J (H.m.感染) に対して有意差有 (P<0.05)

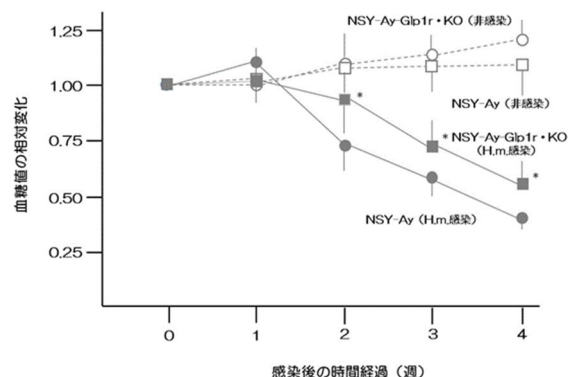


図2 高血糖を自然発症した2種のマウス系統 (NSY-*A^y*, NSY-*A^y*-*Glp1r*・KO) における *H.m.*感染群と非感染群の血糖値の変化
*) NSY-*A^y* (H.m.感染) に対して有意差有 (P<0.05)

以上より、*H.m.*の寄生による高血糖の正常化現象には、GLP1シグナルが関与していることが明らかとな

った。これは *H.m.* 感染により血中の GLP1 濃度が大幅に上昇するという以前の結果を支持するものであった。GLP1 の分泌に関しては腸管内の糖以外に脂質やアミノ酸など多様な物質が分泌刺激となる事が知られている (*J Diabetes*, 8:753, 2016)。したがって、*H.m.* 虫体や虫体分泌物が GLP1 分泌を誘導している可能性が推定される。一方で、2 種類の *Glp1r*-KO マウスは何れも GLP1 シグナルが完全に欠失しているにもかかわらず、*H.m.* 感染により高血糖が正常化した。したがって、この現象には GLP1 シグナル以外の因子が強く関与している事が示唆された。

(2) 高血糖の正常化に関与する GLP1 シグナル以外の因子として腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸を想定し、短鎖脂肪酸受容体 (FFAR2) の欠損マウスに STZ を投与して高血糖を誘発させて (1) と同様の実験を行った。*Ffar2*-KO マウスでは *H.m.* 感染後の血糖値の急激な減少は見られなかった。しかし、B6J 系統の非感染マウスは 7 週齢で 250mg/dl 前後の高血糖を発症した後は *H.m.* を感染させなければ血糖値がほとんど変化がなかったが、*Ffar2*-KO マウスは B6J マウスより STZ 感受性が高く 7 週齢で B6J と同程度の高血糖を発症した後も血糖値が上昇し続けた (図 3)。したがって、*Ffar2*-KO マウスにおいても実質的には *H.m.* 感染は血糖降下作用があると推定された。そこで、非感染群と感染群の血糖値の低下幅を B6J と *Ffar2*-KO で比較し再評価した。その結果、B6J と *Ffar2*-KO の *H.m.* 感染 3 週後の血糖値の低下幅はほぼ同等であり、FFAR2 が高血糖の正常化に関与していない可能性が考えられた (図 4)。

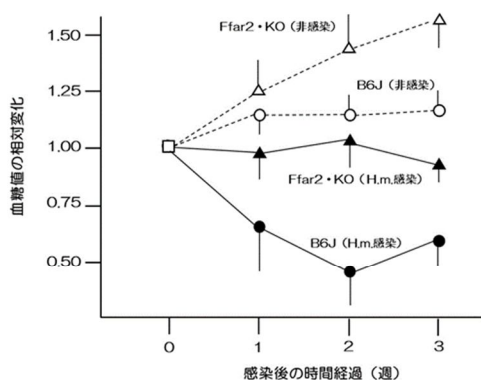


図3 STZ投与で高血糖を発症した2種のマウス系統 (B6J, *Ffar2*-KO) における *H.m.* 感染群と非感染群の血糖値の変化

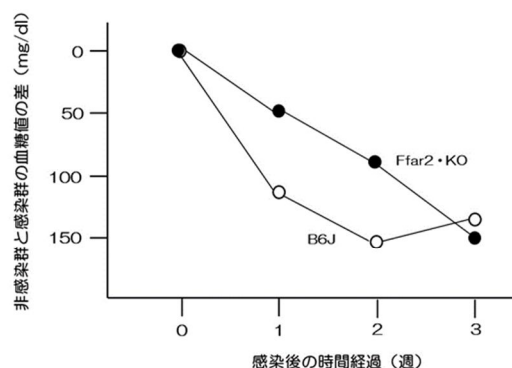


図4 STZ投与で高血糖を発症した2種のマウス系統 (B6J, *Ffar2*-KO) における *H.m.* 感染群と非感染群の血糖値の差

しかし、腸内細菌による短鎖脂肪酸の関与については、別の評価系が必要であると考えられた。そこで腸内細菌の関与を直接的に検証する事を目的として、STZ による高血糖の誘導後にマウスに抗生剤を投与して *H.m.* 感染の血糖降下作用に対する腸内細菌の役割を検証した。その結果、抗生剤投与の有無にかかわらず *H.m.* 感染により高血糖が完全に解消されることが判明した (表 1)。したがって、高血糖の正常化には腸内細菌はほとんど関係していないと考えられた。

表1 *H.m.* 感染による血糖降下作用に対する抗生剤投与の影響

| マウス系統 | n | 抗生剤投与 | <i>H.m.</i> 感染 | 血糖値 (mg/dl) | |
|-------|----|-------|----------------|-------------|-----------------------|
| | | | | 感染前 (7w) | 感染後 (10w) |
| B6J | 6 | - | - | 247 ± 20 | 285 ± 29 ^a |
| B6J | 7 | + | - | 259 ± 35 | 276 ± 34 ^a |
| B6J | 14 | - | + | 250 ± 11 | 144 ± 8 ^b |
| B6J | 8 | + | + | 253 ± 11 | 149 ± 6 ^b |

a, b) 同じ文字間に有意差なし

(3)GLP1 シグナルと腸内細菌以外に高血糖の正常化に関与する因子がないか再検討を行う過程で、B6J, B6J-*Glp1r*-KO, NSY-*A^y*-*Glp1r*-KO 系統では *H.m.*感染マウスの肝臓が非感染マウスのそれより有意に肥大している事が判明した(表2)。また、有意差がなかった NSY-*A^y*でも *H.m.*感染マウスでは肝の肥大傾向が見られた。そこで、*H.m.*感染のマウスの肝臓への影響を検討するため、B6J 系統の感染マウスと非感染マウスとの肝機能について血中の各種酵素濃度(ALT, AST, ALP, T-BIL)を比較した。その結果、特に ALT と AST について *H.m.*感染群では非感染群に対し有意に高値を示し肝障害が起きていることが判明した(表3)。また、病理学的検査では *H.m.*感染マウスの肝臓にはリンパ球の浸潤が観察され軽度の肝炎を発症していると考えられた。以上より、*H.m.*感染はマウスに軽度の肝機能の低下を誘発する事が判明し、これが感染時の血糖値の低下の一因となっている可能性が推定された。

表2 *H.m.*感染による肝臓重量(肝体重比)の変化

| マウス系統 | 非感染 | | <i>H.m.</i> 感染 | |
|--|-----|-------------|----------------|--------------|
| | n | 肝重/体重 (%) | n | 肝重/体重 (%) |
| B6J** | 7 | 5.70 ± 0.13 | 14 | 8.01 ± 0.31* |
| B6J- <i>Glp1r</i> -KO** | 16 | 5.54 ± 0.07 | 12 | 8.39 ± 0.30* |
| NSY- <i>A^y</i> | 6 | 7.51 ± 0.10 | 6 | 7.89 ± 0.22 |
| NSY- <i>A^y</i> - <i>Glp1r</i> -KO | 7 | 7.10 ± 0.23 | 9 | 8.53 ± 0.49* |

*) 非感染に対して有意差有 (P<0.05)
**) STZ投与により高血糖を誘発

表3 *H.m.*感染による肝機能への影響

| 測定項目 | B6J・非感染 | | B6J・ <i>H.m.</i> 感染 | |
|---------------|---------|---------------|---------------------|----------------|
| | n | 平均値 ± SEM | n | 平均値 ± SEM |
| 肝体重比(肝重/体重) | 10 | 0.052 ± 0.001 | 12 | 0.065 ± 0.003* |
| ALT (U/L) | 10 | 19.6 ± 0.9 | 12 | 104.7 ± 42.9* |
| AST (U/L) | 10 | 36.9 ± 1.9 | 12 | 118.6 ± 36.1* |
| ALP (U/L) | 10 | 121.8 ± 4.7 | 12 | 157.3 ± 25.7 |
| T-BIL (mg/dL) | 10 | 0.29 ± 0.01 | 12 | 0.37 ± 0.03* |

*) B6J・非感染に対して有意差有 (P<0.05)

(4)今回の解析から *H.m.*感染による高血糖の正常化には GLP1 シグナルの活性化が関与している事が判明した。最近、腸管寄生虫により腸内細菌叢が変化するという報告が出ているが、少なくとも *H.m.*感染により増殖した腸内細菌が短鎖脂肪酸を産生して血糖値を正常化している可能性は否定された。*H.m.*感染により GLP1 シグナルの活性化する機構は依然として不明であるが、多様な物質が GLP1 の分泌誘導することから、*H.m.*分泌排泄抗原等が GLP1 分泌を促進している可能性が考えられる。ただし、2種の *Glp1r* 遺伝子欠損マウスの解析結果では何れも GLP1 シグナル以外に血糖値を正常化させる因子が存在することを示しており、その有力な因子として *H.m.* に肝毒性がある事が示された。これまで、*H.m.*の宿主(マウス)への病原性は知られていない上、ヒトの糸虫症で肝障害が発生したという事例を耳にしたことがなく、この結果は大変意外であった。膜様糸虫には本解析で使用した *H.m.*以外に、マウスには感染しないがラットを宿主とする *H.diminuta* (*H.d.*)が存在する。*H.d.*は *H.m.*より詳しく解析されており肝毒性はないとされている。今後、*H.d.*感染ラットにおいて GLP1 シグナルの活性化が認められれば、膜様糸虫の虫体や虫体分泌物を用いた GLP1 シグナルの活性化による糖尿病治療薬の開発に繋がるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Ohno T, Miyasaka Y, Yoshida K, Kobayashi M, Horio F, Yokoi N, Mizuno M, Ikegami H | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 A novel model mouse for type 2 diabetes mellitus with early onset and persistent hyperglycemia. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Exp. Anim. | 6. 最初と最後の頁 510-518 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.22-0061 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔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 大野民生、宮坂勇輝、吉田勘太、小林美里、堀尾文彦、横井伯英、水野正司、池上博司。 |
| 2. 発表標題 早期発症し持続的高血糖を示す新たな2型糖尿病モデルマウスNSY.B6-Tyr+,Ay系統。 |
| 3. 学会等名 第36回日本糖尿病肥満動物学会 |
| 4. 発表年 2023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 | 宮坂 勇輝 (Miyasaka Yuki) (30778098) | 名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901) | |

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 |
|---------|---------|