

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19546

研究課題名(和文)腸管免疫制御による高脂肪食インスリン抵抗性発症予防

研究課題名(英文)The physiological roles of Intestinal Immunity in High Fat Diet induced Insulin Resistance

研究代表者

川野 義長 (Kawano, Yoshinaga)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80571463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食事や腸内細菌と密接に関わる、腸管免疫特に腸管樹状細胞や腸管CD4+T細胞に着目して、新規の糖・エネルギー代謝制御メカニズムを検討した。腸管樹状細胞Nlrp10と腸管T細胞Foxoの機能解析を行うため、樹状細胞特異的Nlrp10欠損マウスとCD4細胞特異的Foxo1Foxo3遺伝子改変マウスを作製し代謝表現型を解析した。樹状細胞特異的Nlrp10欠損マウスは、高脂肪食負荷に伴い耐糖能が悪化し、CD4細胞特異的Foxo1Foxo3遺伝子改変マウスは高脂肪食負荷に伴い耐糖能が改善した。今後、樹状細胞Nlrp10およびCD4+T細胞Foxoの標的遺伝子およびその制御メカニズムの検討を続ける。

研究成果の概要(英文)：Foxo1 is important in regulating glucose and energy homeostasis, but little is known about the roles in intestinal T cell under HFD. We generated CD4 T cell specific Foxo1 double Foxo3 hetero-KO(T-QKO) mice, Insulin sensitivity of T-QKO mice was significantly improved compared with control mice. Gene expression of Il4 and Il13 in Peyer's patch from T-QKO were significantly increased compared with control mice. These data suggested that Foxo activation of CD4+Tcell may deteriorate HFD induced insulin resistance. Nlrp10 is known as NLR family and it has been reported that Nlrp10 in Dendritic Cell play important roles in T cell activation and induction of Acquired Immunity. Insulin sensitivity of CD11cNlrp10KO was significantly deteriorated compared with control mice. Gene expression of Foxo3 and Il17 in colon from Nlrp10KO were decreased compared with HFD control mice. These data suggested that Nlrp10 in Dendritic cell may play protective roles in HFD induced insulin resistance

研究分野：インスリン抵抗性

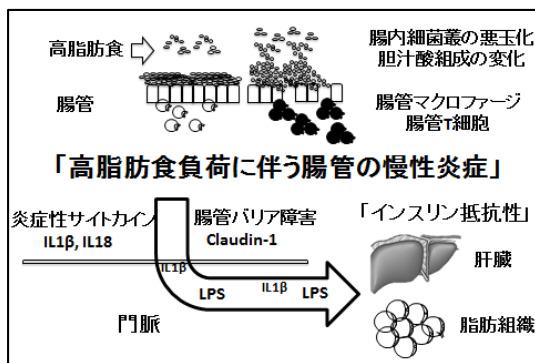
キーワード：インスリン抵抗性 腸管免疫 肥満 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪組織の変化に先んじて、腸内環境の変化が、肥満・インスリン抵抗性発症に重要な役割を担う事が認識されつつある。腸内細菌の役割が注目される一方で、宿主側で食事や腸内細菌と最初に接する人体最大の免疫器官である腸管免疫の糖・エネルギー代謝における役割に関しては不明な点が多い。既報では、痩せマウス腸管では Treg、Th17、ILC3、好酸球といった抗炎症性の免疫細胞が多く、肥満マウス腸管では γ T T 細胞、Th1 T 細胞、CD8+ T 細胞、炎症性マクロファージといった炎症性免疫細胞が多く存在するとされている。それら T 細胞の機能的な役割や、腸管マクロファージや腸管樹状細胞の糖・エネルギー代謝における役割は未解明である。

当該研究者はこれまでに、腸管マクロファージのインスリン抵抗性発症における役割を検討するために、高脂肪食により腸管上皮で発現が増加したマクロファージ誘導ケモカイン Ccl2 に着目し、腸管上皮特異的タモキシフェン誘導型 Ccl2 欠損マウス (Vil-Ccl2KO) の解析を行った。Vil-Ccl2KO では、高脂肪食負荷に伴う炎症性腸管マクロファージの浸潤が抑制され、腸管のバリア機能が改善し、門脈内の細菌内毒素 LPS や炎症性サイトカイン IL-18 の濃度が低下し、耐糖能が改善した (Kawano Y. *Cell Metabolism*.2016) これらから、肥満や高脂肪食負荷に伴う腸管の炎症を抑制する事が、インスリン抵抗性発症や糖代謝を改善する治療標的になる事が示唆された(図 1)。

(図 1) 高脂肪食に伴う腸管慢性炎症



2. 研究の目的

当該研究の目的は、腸管免疫において、腸管マクロファージと同様に重要な役割を果たす腸管樹状細胞と腸管 T 細胞の、肥満や糖尿病発症における病態生理学的役割を明らかにする事である。

3. 研究の方法

当該研究者は、腸管免疫の恒常性を維持する鍵分子として、腸管樹状細胞 Nlrp10 と腸管 T 細胞 Foxo に着目した。

Nlrp10(NOD-like receptor family pyrin domain containing 10)は、腸管において抗原刺激を受けた樹状細胞の腸管リンパ節への遊走や、Th1, Th2, Th17 細胞・IgA 産生 B 細胞といった獲得免疫の誘導に重要な分子と報告されている(Stephanie C. et al, *Nature*, 2012)。

高脂肪食負荷 4 週大腸およびパイエル板において Nlrp10 の発現は有意に増加し、Nlrp10 が高脂肪食負荷による大腸の腸内環境の変化を腸管リンパ節へ伝える役割を果たしている可能性が想定される。高脂肪食負荷下における樹状細胞 Nlrp10 の役割を解明する為、樹状細胞特異的 Nlrp10 ノックアウトマウス を作製し、解析を行った。

Foxo(Forkhead box protein O)は線虫、Drosophila、マウスと種を超えて寿命延長効果をもつ長寿遺伝子であり(Giannakou et al. *Science*2004)、インスリンシグナルの下流で負に制御され、代謝・増殖・分化に重要な転写因子である。T 細胞特異的 Foxo1Foxo3 完全欠損マウスでは抗炎症性の Treg 細胞が誘導されず重症腸炎で寿命が短縮する(Welming O. et al, *nature immunology*, 2010)、即ち腸管 T 細胞 Foxo は通常時は protective に働き、腸管免疫の維持において重要と考えられる。高脂肪食負荷において、脂肪組織に先んじて活性酸素の増加を認め、Foxo が核内移行し T 細胞 Foxo は活性化し、全身に何らかの影響を与える可能性が示唆されるが、高脂肪食負荷下における T 細胞 Foxo の役割に関しては解明されていない。Preliminary に、Foxo1 および Foxo3 単独欠損では、糖・エネルギー代謝の表現型に差異は認めなかったことを確認しており、該研究では、CD4 陽性 T 細胞特異的 Foxo1^{-/-}Foxo3^{-/-}欠損マウス(T-QKO マウス)を中心に解析を行った。

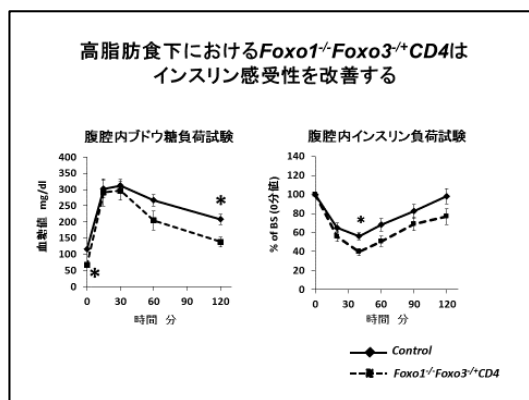
4. 研究成果

Nlrp10 は、腸管樹状細胞が外的刺激を受けて T 細胞の活性化、B 細胞による抗体産生能に重要な役割を果たす NLR ファミリーの 1 つである。樹状細胞マーカー CD11cCre を使用し、CD11c 細胞特異的 Nlrp10 欠損マウスを作製したところ、高脂肪食負荷下において大腸で Foxp3 および IL-17 発現が有意に低下し、腸管の炎症が悪化し耐糖能が悪化した。これらのデータから樹状細胞 Nlrp10 が Treg, Th17 細胞および ILC3 細胞などの分化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。既報

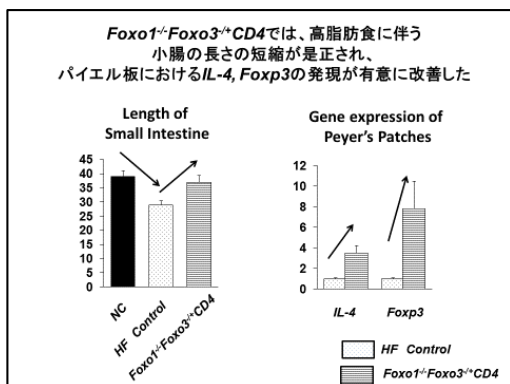
では、Th17 細胞と ILC3 細胞の分化に重要な転写因子 Ror γ t を欠損させたマウスが、肥満を呈する事から、腸管 Th17 細胞や ILC3 細胞が全身の糖・エネルギー代謝を制御している可能性が示唆されており、腸管樹状細胞 Nlrp10 もこれらの分化に影響を与えることで、糖・エネルギー代謝をリモートコントロールする可能性があり、今後解析を進めていく。

T リンパ球特異的 Foxo1 ノックアウト Foxo3 ヘテロノックアウトマウス (T-QuarterKO; 以下 T-QKO と称する) は高脂肪食負荷において負荷 10 週移行コントロールと比較して有意に体重増加が抑制され、耐糖能およびインスリン抵抗性が有意に改善した(図 2)。

(図 2) T-QKO の代謝表現型



T-QKO では、コントロールで認める高脂肪食負荷に伴う小腸の長さの短縮およびパイエル盤の萎縮が有意に改善する。T-QKO における小腸の所属リンパ節であるパイエル盤の炎症関連遺伝子の発現量を Real Time PCR を用いて検討した。その結果、T-QKO のパイエル盤において、Th2 サイトカインの 1 つである IL-4 および Treg マーカーFoxp3 の遺伝子発現がコントロールと比較して有意に増加していた (図 3)。



(図 3) T-QKO の腸管表現型

T-QKO では、酸素消費量の増加による抗肥満の表現型を呈し、寒冷刺激下において Pgc1a 遺伝子発現の有意の増加が褐色脂肪組織および皮下脂肪組織において認められた。また褐色脂肪組織では小腸パイエル盤同様、Th2 サイトカインである IL4 および IL13 遺伝子発現の有意の増加が認められた。

以上から、T リンパ球における Foxo ファミリーは、Th2 リンパ球への分化または変換を抑制する作用があると考えられ、脂肪組織において Th2 サイトカインの発現を抑制することにより、Beige 化を抑制し、最終的にエネルギー消費を抑制する作用があると考えられた。T-QKO の「小腸の慢性炎症の抑制」と「脂肪組織における Beige 化の抑制」をつなぐメカニズムに関しては、今後のさらなる検討が必要と考えられた。

Foxo1 活性調節低分子化合物の同定に関しては、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーのうち構造多様性を考慮した約 1 万化合物においてスクリーニングを行った。約 3SD となる抑制率 25%以上の化合物 144 個、活性化率 60%以上の化合物 144 個をヒット化合物とし、その後細胞毒性がない化合物 (HEK293 細胞に cell titer glo®を用いて評価) 及びその類縁化合物につき再度スクリーニング作業を行い、目標となる活性化化合物 4 つ、抑制化合物 5 つを得た。既知の Foxo 抑制物質である AS1842856®においては 25 μ M での Foxo 抑制率は 37%程であり、当化合物の抑制率は 10 μ M で抑制率が 40%以上であり、大幅に抑制率が大きいことが確認された。今後、引き続き同定されつつある低分子化合物による Foxo1 標的遺伝子発現への影響を検討する。

「今後の課題」

上記結果から、高脂肪食負荷下において腸管 T リンパ球 Foxo は Th2 リンパ球への分化抑制に関わり、小腸の慢性炎症や脂肪組織の Beige 化の抑制を介して、糖・エネルギー代謝に影響を与える事が示唆された。これらのデータは腸管免疫調節を介して、全身の糖・エネルギー代謝を「リモートコントロール」する可能性を示唆しており、糖尿病治療の新規の治療標的となりえる。今後の課題として、腸管 T リンパ球 Foxo の新規の標的遺伝子として、Th2 分化に重要な転写因子 Gata3 に着目し、in vitro での解析を予定している。

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)

[学会発表](計 8 件)

1. 2017年10月7日(ポスター発表、肥満症学「適塾」Award受賞) 杉山和俊、川野義長、茂田文子、中江淳、伊藤裕. 高脂肪食下において腸管樹状細胞 NLRP10 は、全身のインスリン抵抗性を調節する. 第 38 回日本肥満学会(大阪).

2. 2017年10月 川野 義長, 中江 淳, 伊藤 裕. インスリン抵抗性発症における腸管免疫の役割. 第 38 回 日本肥満学会. 学術シンポジウム 8: 肥満症と消化管制御. 2017年10月(大阪)

3. 2017年5月20日(名古屋)(口演、査読有)川野義長, 杉山和俊, 茂田文子, 須田貴司, 中江淳, 伊藤裕. 高脂肪食下において腸管樹状細胞 Pynod/NLRP10 は、大腸の慢性炎症を抑制し、全身のインスリン抵抗性を調節する. 第 60 回日本糖尿病学会.

4. 2016年10月 川野 義長, 中江 淳, 渡辺 信之, 菊地徹洋, 楯谷三四郎, 田守義和, 小野寺雅史, 伊藤 裕. Ccl2-Ccr2 経路を介した高脂肪食負荷に伴う大腸の炎症性マクロファージ浸潤が全身のインスリン抵抗性を引き起こす. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016年10月(横浜)

5. 2016年6月 Kawano Y, Watanabe N, Kikuchi T, Onodera M, Nakae J, Itoh H. Colonic proinflammatory macrophage-Ccl2 axis regulates metabolic homeostasis through IL18 from inflammasome. The 76th the American Diabetes Association's Scientific Sessions. June 10-14, 2016, New Orleans, Louisiana.

6. 2016年6月 Nakae J, Kikuchi T, Kawano Y, Kodani N, Matsuzaki M, Ohira L, Goto N, Shigeta A, Yagi K, Itoh H. FoxO1 and FoxO3 in T cells cooperatively inhibits the thermogenic program of brown and subcutaneous adipose tissues. The 76th the American Diabetes Association's Scientific Sessions. June 10-14, 2016, New Orleans, Louisiana.

7. 2016年5月 菊地徹洋, 中江 淳, 川野義長, 小谷紀子, 松崎素子, 大平理沙, 後藤伸子, 茂田文子, 八木一騎, 伊藤 裕. T リンパ球における Foxo ファミリーは褐色脂肪

組織におけるエネルギー消費を抑制する. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016年5月(京都)

8. 2016年5月21日 川野義長, 中江淳, 菊地徹洋, 楯谷三四郎, 田守義和, 小谷紀子, 松崎素子, 大平理沙, 後藤伸子, 近藤文子, 春日雅人, 伊藤 裕. 腸管上皮 Ccl2 を介した腸管マクロファージ浸潤による慢性炎症がインスリン感受性を調節する. 第 59 回日本糖尿病学会(京都)(口演、査読有)

[図書](計 2 件)

(1) 川野義長, 伊藤裕, 「糖尿病」61 巻 3 号 消化管と糖尿病、糖尿病の病因としての消化管～腸内細菌、腸管免疫と肥満糖尿病、2018年, p100 - 103

(2) 川野義長, 化学評論社、大腸の炎症性マクロファージが Ccl2-Ccr2 依存性に全身のインスリン抵抗性を引き起こす、臨床免疫・アレルギー科、2017年、p466-470、

6. 研究組織

(1)研究代表者

川野 義長 (Kawano, Yoshinaga)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教
研究者番号: 80571463

(2)研究分担者

該当者なし

(3)研究協力者

伊藤 裕 (Itoh, Hiroshi)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授
研究者番号: 40252457

中江 淳, (Nakae, Jun)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授
研究者番号: 00344573