

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07380

研究課題名（和文）新たな非肥満型糖尿病モデルの検討と免疫異常の解明

研究課題名（英文）A novel model of the non-obese diabetes and investigation of immune abnormality

研究代表者

斉藤 真一（Saitoh, Shinichi）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90536674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：インスリン抵抗性と慢性炎症の病態解明は、メタボリックシンドロームへの予防介入を考える上で重要である。新たな非肥満型糖尿病マウスモデルの構築と検証により、糖代謝異常と自然免疫機能の低下との関わりを明らかにした。天然アミノ酸の5-アミノレブリン酸（5-ALA）は、ヘム合成の最初の前駆体であり、生体での糖代謝機能に関与する。5-ALA合成不全マウスは、加齢とともにインスリン抵抗性を発症し、5-ALAを補うことで糖代謝異常が改善される。さらに、好中球の活性酸素種（ROS）の産生能の低下を示し、炎症反応性も低下していた。糖代謝異常と同様、5-ALA補充によりこれら自然免疫機能も改善された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって、5-ALAが糖尿病とその合併症の治療標的としての有用性が期待できる。さらに、本研究では、肥満を伴わずに2型糖尿病が進行するマウスを用いることで、食事誘発性肥満など従来の実験モデルでは困難であった、肥満と炎症の因果関係を切り離すことを可能とした。その中で、インスリン抵抗性マウスの免疫学的異常を明らかにした点は、学術的意義が非常に高い。また、日本人を含むアジア人では軽度の肥満であっても糖尿病発症リスクが増大することが知られており、非肥満型糖尿病と自然免疫機能が関わる可能性の示唆を与えたことは、我が国において社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The chronic inflammation caused by obesity is thought to be the underlying pathology of type 2 diabetes and its complications. Elucidation of the mechanism of inflammation-induced insulin resistance is important in the prevention of intervention in metabolic syndrome. We establish a novel animal model for non-obese diabetes and uncover a link between glucose metabolism and inflammatory response. 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) is a natural amino acid and the first precursor of heme biosynthesis. 5-ALA or heme is associated with glucose metabolism in vivo. We previously showed that 5-ALA synthase ALAS1 heterozygous (Alas1^{+/-}) mice displayed insulin resistance, which was cured by 5-ALA administration. Here, we test whether 5-ALA have any potential effect on innate immune system. Alas1^{+/-} mice exhibited reduced inflammatory responses and 5-ALA administration increased ROS production in neutrophils. These findings show that 5-ALA is a potential therapeutic target against metabolic syndrome.

研究分野：免疫学

キーワード：糖尿病 インスリン抵抗性 慢性炎症 メタボリックシンドローム 5-アミノレブリン酸 自然免疫
好中球 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームの病態基盤としての慢性炎症

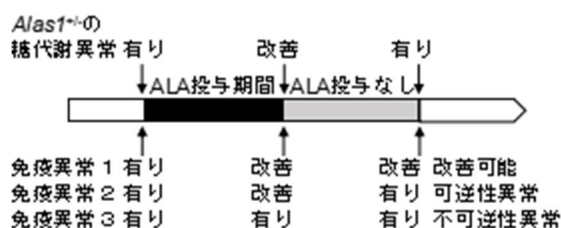
肥満に起因する慢性炎症は、インスリン抵抗性を惹起させ、2型糖尿病とその合併症（腎症・動脈硬化・認知症・易感染など）の基盤病態となると考えられている。しかし、合併症を発症する糖尿病後期は、必ずしも肥満を伴っていない。さらに、日本人を含むアジア人では欧米人と比較し、軽度の肥満であっても糖尿病発症リスクが高くことが知られている。したがって、非肥満型のインスリン抵抗性・2型糖尿病の病態解明は、その合併症の予防を考える上で重要である（Saitoh et al., 2021）。さらに、合併症を発症する糖尿病後期には、インスリン抵抗性と炎症反応の減弱の増悪サイクルが生じて易感染など様々な合併症が生じる。インスリン抵抗性における免疫学的異常を明確にすることで、メタボリックシンドロームへの新たな早期介入の概念を提案できると考えている。

(2) 非肥満型糖尿病モデルの構築

我々は、ヘムの細胞内レベルが、5-アミノレブリン酸（5-ALA）合成酵素 ALAS の活性に大きく依存し、ALAS によるヘム供給が生存に必須であることを明らかにした（中島、2015）。そして、加齢依存的に惹起されるヘム代謝能の低下が糖代謝異常発症に関与するという仮説の元で、ALAS1 遺伝子破壊マウスヘテロ接合体（*Alas1^{+/-}*マウス）を対象とした糖代謝解析を行い、加齢依存的にインスリン抵抗性発症すること、肥満を伴わずに糖代謝異常が進行することを見出した（Saitoh et al., 2018; Van Wijk et al., 2021）。さらに、*Alas1^{+/-}*マウスでは、5-ALA を補うことでそれら異常が改善されることも見出し、インスリン抵抗性のモデルマウスの樹立とそれを改善する事が出来るシステムになりうると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、非肥満型インスリン抵抗性マウスの免疫機能を評価し、糖尿病合併症におけるリスクファクターの探索を目的とした。5-ALA が免疫機能に及ぼす薬理効果およびその機序の解明のために、右図のように 5-ALA 投与前、投与後、投与後一定期間経過後で解析を行い、薬理効果の可逆性、不可逆性を評価した。



3. 研究の方法

(1) *Alas1^{+/-}*マウスの炎症反応性の評価

マウス生体へのリポポリサッカライド（LPS）注射による敗血症誘導実験を行い、敗血症後の生存率の解析とともに、刺激による炎症性サイトカインおよびケモカインの産生量を測定した。

(2) 5-ALA 投与による白血球集団の変化の解析

マウス生体に2週間5-ALA（2mg/ml）を飲水投与し、投与前後での末梢血および組織から白血球集団を採取し、フローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカー解析により、免疫細胞集団の性状を解析した。

(3) 自然免疫担当細胞の機能評価

好中球は、自然免疫系の主要な細胞であり、活性酸素種（ROS）の産生を介してその抗菌機能を発揮する。自然免疫機能の指標として、5-ALA 投与前後のマウス末梢血中の好中球の ROS 産生能および貪食作用を解析した。*in vitro*における5-ALAの効果検証のため、マウス骨髓由来細胞の培養分化系を用いて、サイトカイン遺伝子とミトコンドリア関連遺伝子の遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Alas1^{+/-}*マウスは炎症反応性が減弱している

敗血症誘導実験は、野生型マウスでは致死量となる LPS 用量を用いて実施した。しかし、*Alas1^{+/-}*マウスでは、敗血症後の生存率が上がり、半数が生存した（図1）。LPS 注射後の血中サイトカインの経時変化を測定したところ、野生型マウスの一部では、刺激後短時間で上昇した IL-6 が減少することなく増加し死に至るが、*Alas1^{+/-}*マウスでは上昇した IL-6 はすぐさま減少し、その後生存し（図2）刺激に対する免疫応答能の低下を示した。さらに、5-ALA による効果を検証するために、マウス末梢血全血に *ex vivo* で 5-ALA（最終濃度 100 μM）を添加し、LPS 刺激後のサイトカイン産生能を測定した。その結果、*Alas1^{+/-}*全血において 5-ALA の添加により IL-6、TNFα の放出量が増加した。

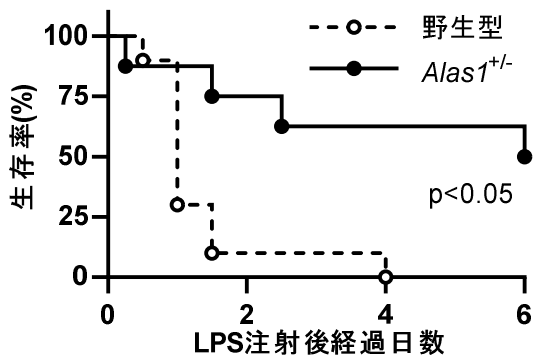


図1 野生型マウスと *ALAS1*^{+/-}マウスの敗血症後の生存率の違い

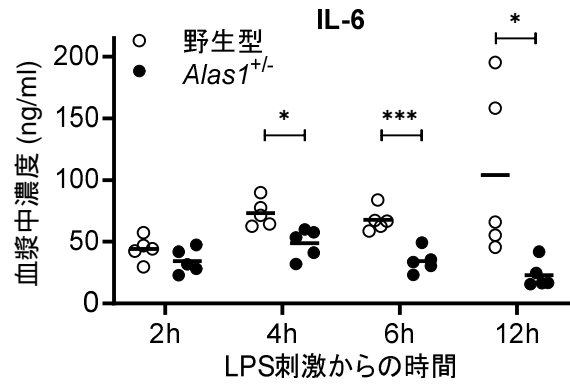


図2 LPS 刺激後の血中サイトカイン濃度の経時変化

(2) *Alas1*^{+/-}マウスは末梢血顆粒球の細胞数が多い

末梢血白血球に関しては、*Alas1*^{+/-}マウスは、野生型マウスと比べて、総白血球数やリンパ球系細胞 (T細胞、B細胞) の数に差はないが、顆粒球細胞数が高い値を示した (図3)。5-ALA 投与を行うと、高値を示した顆粒球、特に好中球の細胞数が野生型マウスと同等の正常値まで減少した (図4)。

内臓脂肪組織におけるマクロファージ集団の分類のため、脂肪細胞を除いた間質血管細胞群を分離し、細胞表面マーカー解析を行ったが、*Alas1*^{+/-}マウスと野生型マウス間でのマクロファージ集団の差異は観察されなかった。

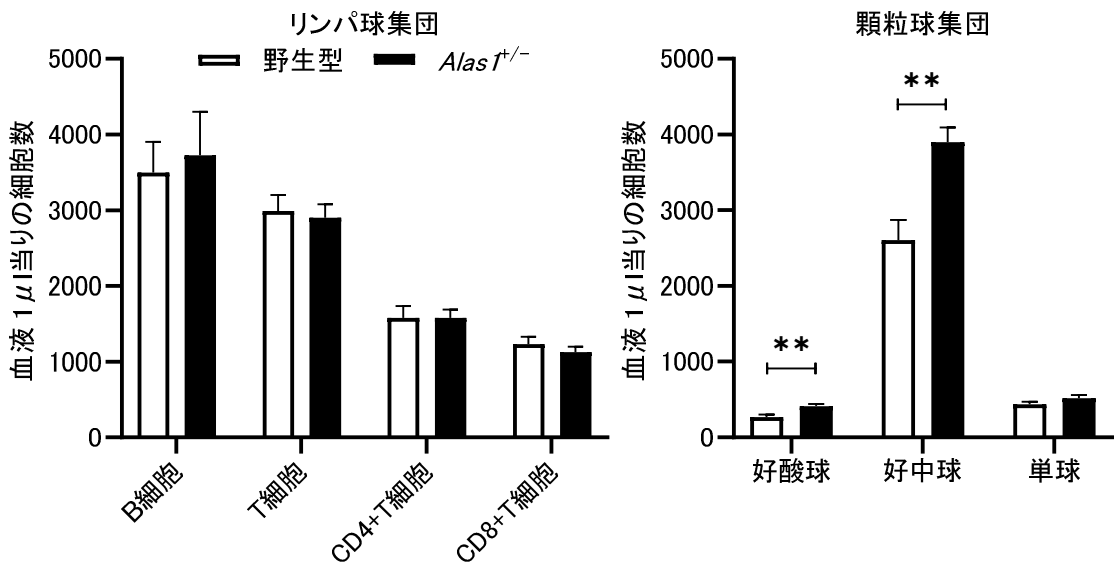


図3 通常条件下での野生型、*ALAS1*^{+/-}マウスの末梢血白血球集団の細胞数の比較

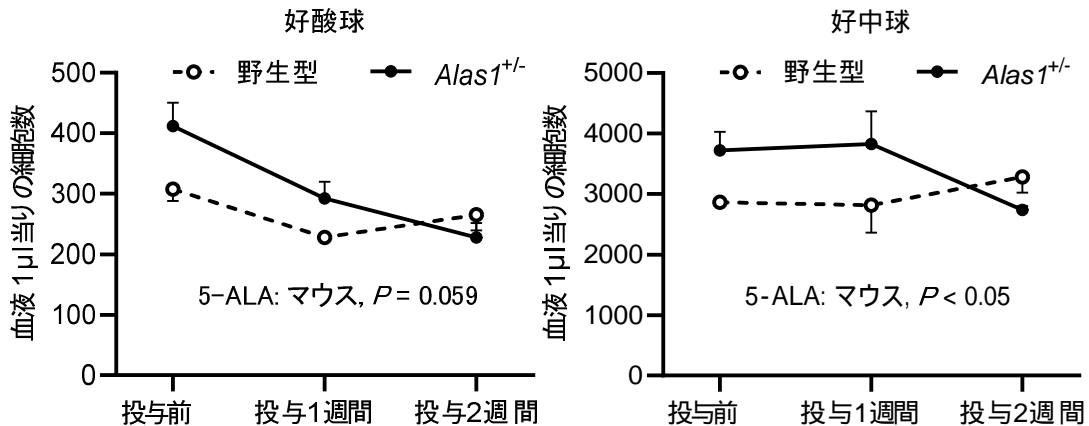


図4 5-ALA 投与による末梢血顆粒球集団の細胞数の変化
(p 値は投与とマウス遺伝型の交互作用の検定)

(3) 5-ALA の欠乏によって自然免疫細胞の機能が低下している

先行研究において、好中球やマクロファージなど貪食細胞では ALAS1 の発現が高いレベルで維持されることを見出し（Okano et al., 2010）、マウス免疫細胞の遺伝子発現データベースにおいてもその結果は裏付けられている（The Tabula Muris Consortium et al., 2020）。そのため、自然免疫担当細胞に対する 5-ALA 欠乏と補充の寄与は大きくなると考え、5-ALA 投与前後の、末梢血好中球の機能の変化を解析した。その結果、*Alas1*^{+/-}マウス由来の好中球において ROS 産生能と貪食作用が減弱していたが、2週間の 5-ALA 飲水投与により改善された（図 5, 6）。さらに、マウス骨髄由来マクロファージを用いた *in vitro* での遺伝子発現解析の結果、5-ALA 添加によるサイトカイン遺伝子の発現亢進が見られ、5-ALA 依存性の反応を再現した。同時に、ミトコンドリア関連遺伝子の一部においても、5-ALA 添加による発現亢進が見られた（図 7）。

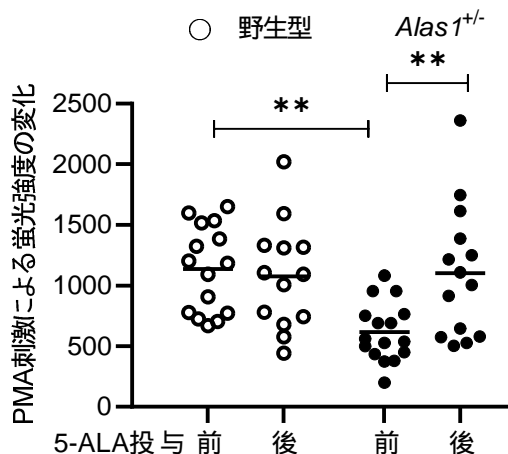


図 5 2週間 5-ALA 投与前後での好中球 ROS 産生能の変化

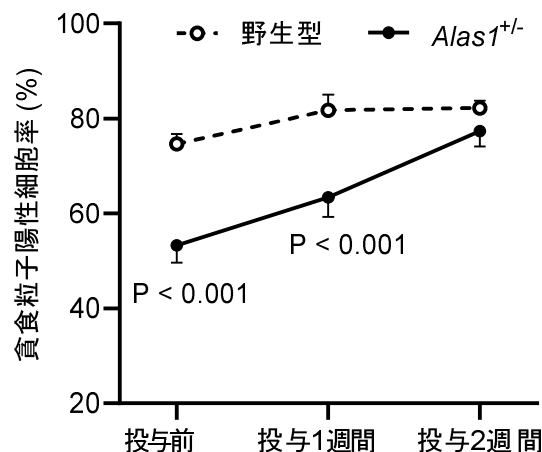


図 6 ALAS1^{+/-}マウスにおける 5-ALA 投与による好中球貪食作用の増強

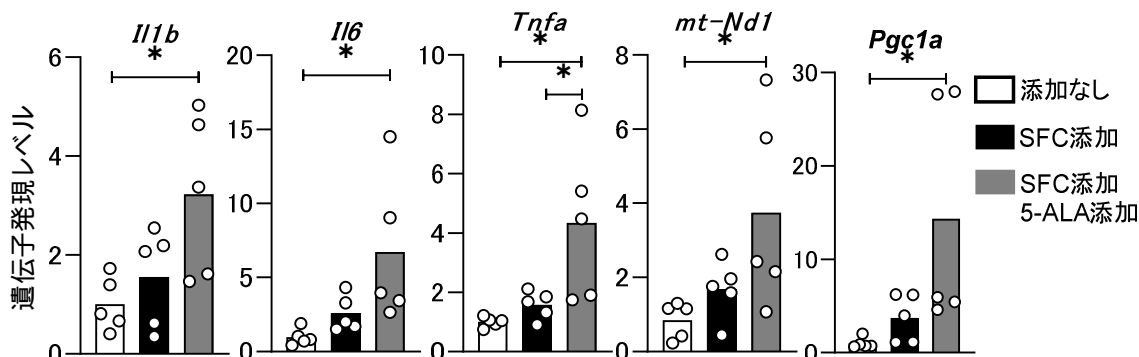


図 7 マウス骨髄由来マクロファージにおけるサイトカイン遺伝子とミトコンドリア関連遺伝子の 5-ALA 添加による発現レベルの変化。鉄剤としてクエン酸第一鉄ナトリウム (SFC) を添加している。

以上のように、非肥満型糖尿病モデルにおける免疫機能を評価した結果、自然免疫機能の低下が糖尿病及びその合併症の発症に関与する可能性が示された。5-ALA の補充は、ヘム合成の促進を介して、ミトコンドリア機能の変化を伴うと考えられる。今後は、5-ALA 欠乏による免疫細胞のエネルギー代謝不全の有無を確認し、ミトコンドリア機能が合併症発症制御の指標となるかを検証する予定である。

<引用文献>

Saitoh S., van Wijk K., Nakajima O., Crosstalk between metabolic disorders and immune cells, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 2021, 10017
 中島 修, 5-アミノレブリン酸およびヘムの代謝への影響、現代化学増刊 45, 2015, 127-134
 Saitoh S., Okano S., Nohara H., Nakano H., Shirasawa N., Naito A., Yamamoto M., Kelly V.P., Takahashi K., Tanaka T., Nakajima M., Nakajima O., 5-aminolevulinic acid (ALA) deficiency causes impaired glucose tolerance and insulin resistance coincident with an attenuation of mitochondrial function in aged mice, *PLoS ONE*, 13, 2018, e0189593
 van Wijk K., Akabane T., Kimura T., Saitoh S., Okano S., Kelly V.P., Takagi M., Kodama K., Takahashi K., Tanaka T., Nakajima M., Nakajima O., Heterozygous disruption of ALAS1 in

mice causes an accelerated age-dependent reduction in free heme, but not total heme, in skeletal muscle and liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, 697, 2021, 108721

Okano S., Zhou L., Kusaka T., Shibata K., Shimizu K., Gao X., Kikuchi Y., Togashi Y., Hosoya T., Takahashi S., Nakajima O., Yamamoto M., Indispensable function for embryogenesis, expression and regulation of the nonspecific form of the 5-aminolevulinic acid synthase gene in mouse, *Genes Cells*, 15, 2010, 77-89

The Tabula Muris Consortium, Almanzar N., Antony J., Baghel A. S., Bakerman I., Bansal I., Barres B. A., Beachy P. A., Berdnik D., Bilen B., Brownfield D., Cain C., A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse, *Nature*, 583, 2020, 590-595

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 van Wijk Koen, Akabane Takeru, Kimura Tomohiro, Saitoh Shinichi, Okano Satoshi, Kelly Vincent P., Takagi Michiaki, Kodama Ken, Takahashi Kiwamu, Tanaka Tohru, Nakajima Motowo, Nakajima Osamu	4. 巻 697
2. 論文標題 Heterozygous disruption of ALAS1 in mice causes an accelerated age-dependent reduction in free heme, but not total heme, in skeletal muscle and liver	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108721 ~ 108721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saitoh Shinichi, Van Wijk Koen, Nakajima Osamu	4. 巻 22
2. 論文標題 Crosstalk between Metabolic Disorders and Immune Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10017 ~ 10017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221810017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 斉藤真一、武田裕司、Koen van Wijk、木村朋寛、岡野聡、尾崎司、浅尾裕信、中島修
2. 発表標題 ALA生合成不全マウ糖代謝異常の分子機構解析
3. 学会等名 第9回ポルフィリン-ALA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉藤真一、荒木明美、武田裕司、浅尾裕信
2. 発表標題 IL-21isoform過剰発現マウスにおける高脂肪食性肥満の抑制と脂肪組織異常
3. 学会等名 第73回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤真一、荒木明美、武田裕司、Koen van Wijk、木村朋寛、岡野聡、中島修、浅尾裕信
2. 発表標題 5-ALA生合成不全マウスにおける非肥満型糖尿病モデルの検討と免疫異常の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Araki Akemi, Jin Lianjin, Nara Hidetoshi, Takeda Yuji, Saitoh Shinichi, Nemoto Nobuhito, Md Yeashin Gazi, and Asao Hironobu
2. 発表標題 Increased Development of Colitis-Associated Colon Cancer in IL-21-isoform transgenic mice: Possible Involvement of Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saitoh Shinichi, Takeda Yuji, Wijk Koen van, Kimura Tomohiro, Okano Satoshi, Nakajima Osamu, and Hironobu Asao
2. 発表標題 Immune abnormality in 5-aminolevulinic acid (ALA) synthesis deficient mice, which is a novel model of the non-obese diabetes
3. 学会等名 The 7th International ALA and Porphyrin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤真一、武田裕司、Koen van Wijk、中島修、浅尾裕信
2. 発表標題 5-アミノレブリン酸(5-ALA)生合成不全マウスにおける非肥満型インスリン抵抗性の発症と免疫応答・サイトカイン産生能の低下
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saitoh S, Takeda Y, van Wijk K, Nakajima O, Asao H.
2. 発表標題 5-aminolevulinic acid (5-ALA) synthesis deficient mice display an immune abnormality and reduced cytokine release
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤真一、武田裕司、Koen van Wijk、岡野聡、中島修、浅尾裕信
2. 発表標題 5-アミノレブリン酸生成不全マウスは炎症反応性が低下する
3. 学会等名 第10回ポルフィリン-ALA学会年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	浅尾 裕信 (Asao Hironobu) (80250744)	山形大学・医学部・教授 (11501)	
研究分担者	中島 修 (Nakajima Osamu) (80312841)	山形大学・医学部・教授 (11501)	
研究分担者	武田 裕司 (Takeda Yuji) (90302299)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	

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