

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 2 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580337

研究課題名（和文） 糖尿病改善をめざした非炎症性マクロファージの誘導と小腸における糖吸収機構への関与

研究課題名（英文） Induction of alternative activation of macrophages and alterations in intestinal epithelial cell function by Th2 cytokines for type 2 diabetes therapy.

## 研究代表者

森本 素子（MORIMOTO MOTOKO）

宮城大学・食産業学部・教授

研究者番号：30250301

## 研究成果の概要（和文）：

2 型糖尿病（T2D）モデルマウスである KK-Ay/TaJcl マウスに消化管内寄生虫である *Heligmosomoides polygyrus* (*Hp*) を感染させて 2 型免疫応答を誘導し、糖尿病病態の変化、非炎症性マクロファージ（AAMacs）の分化、および糖輸送担体の発現について調べた。その結果、線虫感染によって 2 型サイトカイン遺伝子の発現が上昇し、AAMacs が誘導され、小腸における GLUT2 および SGLT-1 の発現が減少し、血糖値の低下、肝臓の炎症や肝機能障害の軽減、脂肪肝の改善傾向が観察された。したがって、*Hp* 感染によって 2 型サイトカインを増大させ、非炎症性マクロファージを誘導することは糖尿病病態改善に有効であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

KK-Ay/TaJcl mice, an animal models of type 2 diabetes were inoculated with infective third-stage *Heligmosomoides polygyrus* (*Hp*) larvae and studied at day8 after infection. Th2 cytokine gene expression was elevated, and AAMacs were accumulated in the small intestine. The gene expression of GLUT-2 and SGLT-1 was down regulated. Helminth infection could reduce blood glucose level and the liver enzyme levels and improve a fatty liver. Inducing intestinal AAMacs by *Hp* infection could have therapeutic importance for T2D.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学  
キーワード：糖尿病、マクロファージ、寄生虫、GLUT

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における代謝性疾患、特にインスリン非依存型糖尿病（2型糖尿病）は増加の一途をたどっており、現在もっとも対策の急がれる疾患のひとつである。肥満に伴うインスリン抵抗性の誘導に、脂肪組織に集積したマクロファージの産生する炎症性サイトカインが関与していることから、糖尿病の病態と免疫細胞との関連が注目されている。これまでマクロファージは炎症性反応の要とされてきたが、最近、炎症性マクロファージと拮抗するフェノタイプのマクロファージ (alternatively activated macrophages:AAMacs)が発見された。AAMacs はインターロイキン4 (IL-4) および 13(IL-13)などの 2 型サイトカインの作用によって分化誘導される。また、脂肪酸代謝に重要な役割を果たす核内受容体である peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )が AAMacs の分化に必須であること、PPAR $\gamma$  欠損マウスではインスリン耐性が誘導されることが報告され(Odgebraard, JI, et al., *Nature* 447,1116-1121,2007)、代謝系と免疫応答のクロストークの解明に向け研究の先鞭がつけられた。

研究代表者は、これまで線虫感染をモデルにした 2 型免疫応答の研究、特に消化管における 2 型サイトカインの発現と消化管上皮および平滑筋の機能的変化について報告してきた (Morimoto M, et al., *J. Immunol*, 2004,2006,2009)。線虫に感染すると、IL-4 および IL-13 の発現が増大することによって、小腸平滑筋の運動性が増すと同時に粘膜から大量の粘液を排出して、物理的に虫を排除しようとする反応が起こる。この時、小腸上皮の機能的変化が起こり、糖の吸収が著しく

抑制されることがわかっているが、この反応は IL-4 および IL-13 のシグナル伝達因子である STAT6 に依存する(Madden, KB,et al., *J Immunol*. 172,5616-21,2004.)。したがって、小腸における寄生虫感染後の糖の吸収抑制が 2 型サイトカイン依存性に誘導されることは明らかである。

## 2. 研究の目的

糖尿病の薬物治療にはいくつかのターゲットポイントがあるが、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤によって食後の糖の吸収を抑制する、あるいは遅らせる治療は、血糖値の急激な上昇を防ぐため、有効な治療法である。したがって、線虫が感染したときに小腸上皮に起こる機能的変化の分子メカニズムを明らかにすることにより、糖尿病治療に応用できるのではないかと考えた。もっとも考えられる分子レベルの変化は、感染によって小腸上皮のグルコーストランスポーター (GLUT) の数や分布が変化するという可能性である。GLUT の発現は食事によって変化するといわれるが (Kellett GL, et al., *Biochem. J.* 350, 155-162, 2000)、不飽和脂肪酸がマクロファージの AAMacs への分化を促進すること (Odgebraard, JI, et al., *Cell Metab.* 496-507, 2008)、また、不飽和脂肪酸には血糖値を改善する効果のあることを合わせて考えた結果、AAMacs が GLUT の発現強度や数に関与して糖の吸収を抑制するのではないかという仮説に至った。そこで、Balb/c マウスに線虫を感染させて小腸の遺伝子解析を行ったところ、AAMacs のマーカーである ARG-1 の発現増強とともに、GLUT2 の発現が有意に抑制されることが確認された。さらに、線虫感染によって小腸に集積するマ

クロファージのフェノタイプを免疫染色にて同定したところ、線虫が粘膜下に形成するシストの周辺に多数の AAMacs が集積していることを確認した。これらの AAMacs は基底膜側から上皮細胞に接触し、GLUT の発現に関与するのではないかと推察された。そこで、本研究では、小腸における糖の吸収機構に焦点をあて、2 型サイトカインおよび AAMacs の糖尿病への関与について分子レベルで明らかにし、代謝系と免疫系のネットワークによる血糖コントロールの機序を解明して、糖尿病治療における新たな戦略を提案することを目的とした。

### 3. 研究の方法

げっ歯類の消化管内寄生虫である *Hp* の 3 期幼虫が経口的に感染すると、宿主小腸の粘膜内でシストを形成して成熟し、8 日目にそのシストをやぶって腸管腔内に出る。これに対し、宿主側では 2 型サイトカインが大量に産生されて小腸上皮の機能性に変化が生じ、粘膜から多量の粘液が産生され、腸管平滑筋の収縮が起こって虫を排除しようとする。この機能性変化に伴い、小腸上皮からの糖吸収が抑制される現象が認められる。したがって、本研究では、2 型サイトカイン発現が十分上昇する感染 8 日後のモデルを使用した。

2 型糖尿病の疾患モデルである KK-A $\gamma$ /TaJc1 マウスを用い、径時的な尿検査により尿糖値上昇を確認後、*Hp* の 3 期幼虫を感染させ、感染 8 日後にと殺して血液、肝臓、小腸を採取した。血清の生化学検査により肝機能の変化について調べ、さらに、肝臓はパラフィンブロックを作成して病理組織検査を行った。続いて、小腸から RNA を抽出後 cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて、炎症性サイトカイン (IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6)、2 型サイトカイン (IL-4、IL-13)、および小腸に発現して

いるグルコーストランスポーターである SGLT-1、GLUT-2、マクロファージのマーカーである ARG-1 の遺伝子発現定量解析を行った。さらに、それらの変化をタンパク面からも検証するため、小腸組織切片を作成し、F4/80、CD206 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、マクロファージのフェノタイプを同定した。GLUT に対する抗体を用いて同様に免疫染色を行い、小腸粘膜における分布および発現強度がどのように変化するのか調べた。

### 4. 研究成果

線虫感染によって 2 型サイトカイン遺伝子の発現が上昇し、血糖値の低下 (図 1)、グルコース負荷試験結果の改善 (図 2)、生化学検査結果の改善傾向 (図 3) が観察された。

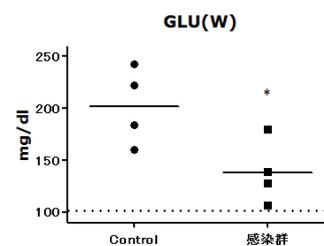


図 1. 血糖値の変化

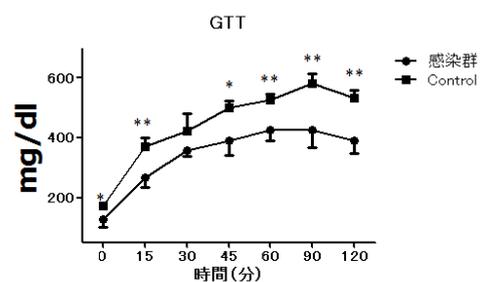


図 2. グルコース負荷試験

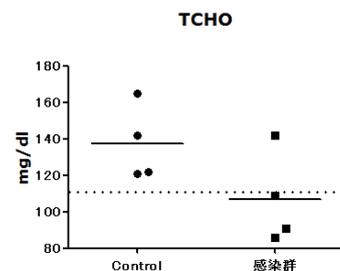


図 3. 血中総コレステロール値の変化

また AAMacs のマーカーである ARG-1 の発現も有意に上昇しており (図 4 A)、小腸の蛍光免疫染色によって多数の AAMacs が誘導されていることが確認された (図 4 B)。

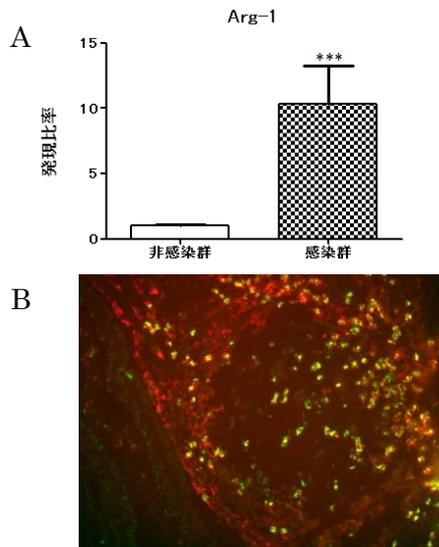


図 4. 小腸における ARG-1 遺伝子の発現 (A) および小腸に集積した AAMacs (黄色) (B)

小腸における糖輸送担体の遺伝子発現解析では、感染群において GLUT2 および SGLT-1 が有意に減少し (図 5)、2 型サイトカイン有意の局所環境が小腸における糖吸収に影響を与え、肝臓の脂肪蓄積を改善する可能性が

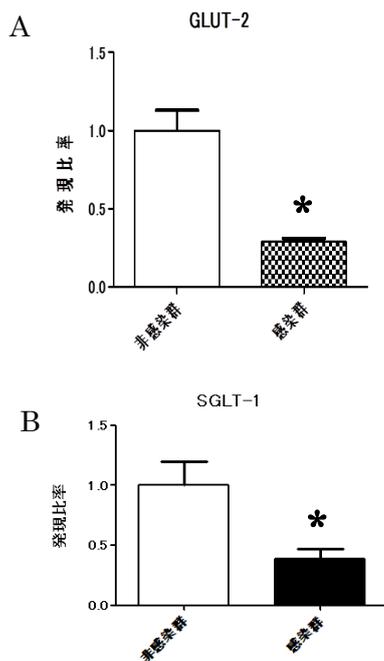


図 5. 小腸における GLUT-2 (A) および SGLT-1 (B) 遺伝子の発現

示唆された。

また、AAMacs の分化に関わる重要な因子である脂肪酸に注目し、糖尿病モデルマウスである KK-Ay/TaJcl マウスに n-3 系列の多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) を投与し、糖尿病病態の変化、AAMacs の分化、および糖輸送担体 (GLUT) の発現について調べた。その結果、DHA 投与群では血糖値および肝機能に改善が見られた。また、脂肪組織において AAMacs のマーカーである ARG-1 遺伝子の発現が有意に増大し、さらに、IL-10 遺伝子の増大も認められた。しかし、炎症の指標となる IL-6、TNF $\alpha$  に有意な差はなく、アディポネクチンにも差は認められなかった。小腸における GLUT2 の発現にも差はなく、DHA によって脂肪組織に AAMacs が誘導される可能性は示唆されるものの、小腸における糖の吸収抑制に関与するという結論は得られなかった。さらに、*Hp* と感染様式が異なる消化管寄生線虫である *Nippostrongylus brasiliensis* (*Nb*) を用いて同様の解析を行った。*Nb* は宿主に強力な 2 型免疫応答を誘導するが、*Hp* とは異なり、小腸粘膜下には侵入しないため、宿主に対する侵襲性が低いという利点が考えられた。しかし、*Nb* 感染により血糖値の低下や血中コレステロールの減少は認められたが、糖輸送担体の発現は変化しなかった。また、2 型サイトカインによって分化が誘導される AAMacs のマーカーである ARG-1 も小腸において増加が認められなかった。したがって、粘膜下に侵入しない *Nb* では AAMacs の誘導が十分に起こらず、炎症改善や糖輸送担体の発現抑制には至らない可能性が示唆された。以上の結果から、小腸粘膜に侵入する感染様式を持つ *Hp* 感染によって 2 型サイトカインを増大させ、非炎症性マクロファージ誘導することは糖尿病病態改善に有効であ

ると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) 東憲嗣、阿部達也、赤松由唯、森本素子、糖尿病病態改善をめざした 2 型免疫応答の誘導—第 2 報—、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 09 月、岩手大学（岩手県盛岡市）
- (2) 東憲嗣、門脇光、須藤佳子、武藤千鶴、森本素子、糖尿病病態改善に向けた 2 型免疫応答および非炎症性マクロファージの誘導、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 09 月、帯広畜産大学（北海道帯広市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本 素子 (MORIMOTO MOTOKO)

宮城大学・食産業学部・教授

研究者番号：30250301