

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591342

研究課題名(和文)腸内細菌叢の免疫学的制御による代謝異常治療法の開発

研究課題名(英文)The therapy for metabolic disorder by immune-regulation of gut microbiome.

## 研究代表者

入江 潤一郎(IRIE, JUNICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70306687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢と腸管免疫担当細胞は相互に作用をしながら、腸管内代謝産物や腸管ホルモン応答を介して宿主のエネルギー代謝の恒常性維持に寄与しており、その破綻がエネルギー代謝異常症、すなわち肥満症や糖尿病を引き起こすと考えられた。腸内細菌、腸管免疫細胞、腸管内容物が形成する腸内環境を標的とした肥満症や糖尿病の新規治療法開発の方向性が本研究から示された。

研究成果の概要(英文)：Gut microbiome and intestinal immune cells interact with each other and contribute to the maintenance of host energy homeostasis by intestinal metabolites and hormone responses. The breakdown of the balance is supposed to initiate the dysregulation of energy homeostasis such as obesity and diabetes. Our findings indicate that the therapy targeting these components could be a novel strategy to resolve metabolic disorders.

研究分野：代謝学

キーワード：エネルギー代謝異常症 糖尿病 肥満症 腸内細菌

### 1. 研究開始当初の背景

肥満やメタボリックシンドロームは現在の本邦を含めた先進国の疾病構造の中核をなす病態であるが、未だにその成因や有効な治療法が見出されていない。近年、肥満や糖尿病の発症に免疫・炎症が関与しているとの報告がなされており、脂肪組織中のマクロファージやTリンパ球が代謝異常症の発症に寄与するとの報告が実験動物やヒトで多くなされている。現在では代謝異常症に慢性炎症が伴うことは間違いのない事実と考えられているが、炎症の主座が脂肪組織のみであるかは明らかとはなっていない。研究代表者は免疫学的視点から代謝異常症を検討し、免疫担当細胞が肝臓で low grade な炎症を起こすことが代謝異常症につながることを見出した(2007年~2011年度科研費若手B:研究代表者 入江)。

これまでのメタボリックシンドロームや肥満の研究は、エネルギー代謝異常症としてその代謝過程の異常を見出すことに主眼が置かれていた。しかし近年、個体のエネルギー摂取の過程における異常が注目をされ研究が行われるようになってきている。すなわち、個体の維持に必要なエネルギーは消化管から吸収されるが、その消化吸收の過程におけるエネルギー消費、産生については解明が不十分であった。特にその腸内の状態に大きな影響を与える因子として“腸内細菌”が個体のエネルギー代謝に影響を与えることが明らかとなり注目を集めている。マウスにおいてインスリン抵抗性を呈する個体と正常個体では腸内細菌叢の組成が異なること、また同様にヒトでも肥満者と非肥満者では腸内細菌叢が異なることが報告された。さらに肥満動物の腸内細菌を他の動物に移植するとその動物が肥満を呈することも明らかとなったが、その機序の詳細は明らかでない。

研究代表者は、腸内細菌の16SrRNAのタイピングを利用した腸内細菌解析法を開発改良し、通常食を与えたマウスと高脂肪食を与えたマウスで腸内細菌叢組成が変化することが検出可能であることを予備実験で確認した。また高脂肪食を与えた肥満モデル動物に抗肥満効果を有する抗糖尿病剤を与えると、腸内細菌叢が変化することも見出した。(添田、入江ら:第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月)。さらにマウス種が異なると腸内細菌叢組成が異なること、肥満感受性マウスと肥満抵抗性マウスでは腸内細菌叢組成が異なり、所謂“善玉腸内細菌”が肥満抵抗性マウスでは豊富であることを見出した。腸内細菌を一切有さない無菌マウスは肥満抵抗性であることも確認しており、本腸内細菌叢の差異が肥満感受性を規定していることが予想された。しかしこの個体の細菌組成を規定している因子は不明であった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では個体の腸内細菌叢を規

定する因子に腸管免疫を想定した。既に炎症性腸疾患では疾患に関わる腸内細菌と腸管免疫との相互連関が検討をされている。研究代表者が現在までに明らかとしてきた免疫学的知見を踏まえ、免疫学的アプローチを腸管に注目して、肥満やメタボリックシンドロームなどの代謝異常症に展開させることを本研究の目的とした(Irie J, J Exp Med; 2006, Diabetes; 2007, J Immunol 2008, 2011)

### 3. 研究の方法

(1) 食事内容が腸内環境、腸管免疫に与える影響の検討。

雄性 C57BL/6 マウス(4-6 週令)に対し、通常食、高脂肪食および抗糖尿病薬を含んだ高脂肪食を与え経過を追跡する。体重、摂餌量は週 2 回観察し、4 週間ごとに空腹時の採血を行い血糖、血清中の肝機能、脂質プロファイルを測定する。約 12 週間飼育したところで各マウスの回盲部より腸管壁および便を採取し、便については便中細菌を 16SrRNA のタイピング法を用いて解析しプロファイリングを行う。同時に小腸から腸上皮間リンパ球、マクロファージを抽出し、フローサイトメーターで表面マーカーを解する。

(2) 無菌環境における腸内環境の評価

無菌マウスに上記と同様の普通食、高脂肪食、抗糖尿病薬を投与し、腸管の免疫細胞群の変化の検討を進める。またこれらの治療法により通常マウスで変化した腸内細菌叢を無菌マウスに与え、その菌叢を移植されたマウスの腸管免疫細胞の組成の検討を進める。

(3) 腸内環境を規定する腸管免疫・腸内細菌連関の検討

次に肥満、糖尿病の病態形成に関わると考えられる腸管免疫担当細胞に対する除去抗体を高脂肪食を与えた雄性 C57BL/6 マウスに投与し、腸内細菌叢組成が非肥満型となるかを検証する。またその免疫担当細胞群を各治療群から抽出し、遺伝子発現を比較検討する。催炎症サイトカインなど肥満の形成、代謝異常症の悪化に関与すると推測できる遺伝子に発現変化が認められた場合、その物質に対する中和抗体を投与し同様に代謝異常症の改善が認められるかを検討する。

さらに本免疫療法を無菌下で飼育し高脂肪食を与えた雄性 C57BL/6 マウスにも行い、代謝異常症の改善が認められるか否かを検討する。

最後に抗糖尿病薬の効果に免疫細胞を介した腸内細菌叢の変化が必須であることを明らかとするために、リンパ球を有さない CB17-scid/scid マウスに上記の治療を行い経過を追跡する。

### 4. 研究成果

(1) 高脂肪食の投与は肥満を誘導し、内臓脂肪、皮下脂肪とも増加を認めた。高脂肪食により誘導された肥満により血糖値、インスリン値は有意に増加を認めた。腸内細菌組成は

各群間で差異を認めた。特にファームキユティス門の腸内細菌群が高脂肪食の投与で増加を認め、抗糖尿病薬の投与によりこれらの細菌群の低下を認めた。一方バクテロイデス門の腸内細菌群は高脂肪食の投与で減少し、抗糖尿病薬の投与で増加を認めた。腸管免疫にかかわる細胞群では、高脂肪食の摂取でCD4陽性T細胞が腸管で増加傾向を認めた。またMCP1に代表されるケモカインの遺伝子発現が高脂肪食の投与により亢進を認め、抗糖尿病薬の投与によりこれらの遺伝子発現の低下が認められた。

(2)無菌マウスに普通食、高脂肪食、抗糖尿病薬を投与し、腸管の免疫細胞群の変化の検討を行うと、無菌マウスの免疫担当細胞は通常マウスの免疫細胞群と大きく異なっていたが、抗糖尿病薬で変化が生じていた。これらの薬物治療により通常マウスで変化した腸内細菌群を無菌マウスに与えたところ、必ずしもドナーの腸内細菌叢組成がレシピエントで維持はされず、腸内細菌叢の形成には免疫担当細胞が重要であることが明らかとなった。

(3)肥満・糖尿病の病態形成に関わると考えられた腸管免疫担当細胞に対する除去抗体を、高脂肪食を与えた肥満誘導マウスに投与をした。抗体の投与により誘導される肥満の軽減がもたらされたが、腸内細菌の変化は一時的であった。抗体を投与されたマウスでは催炎症サイトカインなどの肥満の形成、エネルギー代謝異常症の悪化への関与が考えられる遺伝子の発現は低下を認めていた。

本抗体による免疫学的治療を無菌環境下で飼育した高脂肪食誘導肥満マウスに行ったところ、無菌環境ではエネルギー代謝異常症の程度は軽度であり、本治療による代謝異常症の改善は軽度であった。

これに合致するように免疫不全動物においてもこれらの治療によるエネルギー代謝異常症の程度は軽度であり、薬物の治療効果も軽度であった。

本研究から、腸内細菌および腸管免疫担当細胞が形成する“腸内環境”が宿主のエネルギー代謝異常症の形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。さらに腸内細菌と腸管免疫担当細胞はそれぞれ互いに影響を与えあい決定をされており、さらに腸内環境は、食事内容の変化および宿主のエネルギー代謝の状態にも影響を受けて規定されていることも明らかとなった。すなわち腸内細菌、腸管免疫担当細胞、腸管内容物は一つの臓器ともよべる代謝機構を構築しており、腸管内容物、腸内細菌、および腸管免疫担当細胞のいずれのコンポーネントからアプローチをしても腸内環境の変容をもたらすことが明らかとなった。これまで食事組成、腸内細菌叢、腸管免疫担当細胞のそれぞれの独立した個体への影響を検討をした研究は多く存在するが、これらを包括的に解釈をしたものは本検討が初めてであろう。

またこれらの腸内環境への介入の期待される効果が、肥満や2型糖尿病のようなエネルギー代謝異常症の改善であることも本研究の特筆すべき点であろう。

これまでの腸内細菌を含めた腸内環境を標的とした治療応用の研究では、その個人の安定性が常に治療の障壁となってきた。しかし本研究で検討がなされた、腸内環境を形成する各コンポーネントに対する介入によっては、腸内環境の平衡のバランスポイントを変更しうる可能性が示されたといえよう。本研究をさらに今後発展させ、腸内環境の整備を介した、生活習慣病の新規治療法の開発に繋がっていくことが期待できよう。

## 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5件)

入江潤一郎、伊藤裕、腸内細菌と代謝異常症、日本肥満学会誌、査読無、20巻、2014、26-31

入江潤一郎、伊藤裕、腸内細菌叢と内分泌・代謝疾患、日本内科学会雑誌、査読無、103巻、2014、2813-2819

Sugizaki T, Watanabe M, Horai Y, Kaneko-Iwasaki N, Arita E, Miyazaki T, Morimoto K, Honda A, Irie J, Itoh H, The Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) inhibitor ezetimibe improves metabolic disease via decreased liver X receptor (LXR) activity in liver of obese male mice, *Endocrinology*, 査読有、155巻、2014、2810-2819

Nakamura Y, Kanai T, Saeki K, Takabe M, Irie J, Miyoshi J, Mikami Y, Teratani T, Suzuki T, Miyata N, Hisamatsu T, Nakamoto N, Yamagishi Y, Higuchi H, Ebinuma H, Hozawa S, Saito H, Itoh H, Hibi T, CCR2 knockout exacerbates cerulein-induced chronic pancreatitis with hyperglycemia via decreased GLP-1 receptor expression and insulin secretion, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 査読有、304巻、2013、G700-707

Kodama K, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, Sirota M, Morgan AA, Chen R, Ohtsu H, Maeda S, Kadowaki T, Butte AJ. Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有、109巻、2012、7049-7054

[学会発表](計12件)

入江潤一郎、糖尿病と腸内細菌、第49回糖尿病学の進歩、2015年2月20日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

入江潤一郎、インクレチン・インクレチン関連薬と腸内環境、第18回日本心血管内分

泌学会学術総会、2014年11月21日、横浜市開港記念会館（神奈川県横浜市）

入江潤一郎、腸内環境をふまえた肥満・糖尿病治療の工夫、第50回糖尿病週間講演会、2014年11月8日、よみうりホール（東京都千代田区）

入江潤一郎、腸内細菌と腸管ホルモン、第35回日本肥満学会、2014年10月25日、シーガイアコンベンションセンター（宮崎県宮崎市）

入江潤一郎、腸内細菌叢と代謝異常症、第46回日本動脈硬化学会学術集会、2014年7月10日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

入江潤一郎、腸内環境：減量外科手術の新規治療標的、Japanese Society for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders、2014年7月5日、滋賀県立県民交流センターピアザ淡海（滋賀県大津市）

入江潤一郎、腸管環境と代謝異常症、第56回日本老年医学会学術集会、2014年6月13日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

入江潤一郎、腸内細菌による腸内環境整備と個体の代謝制御、第14回日本抗加齢医学会総会、2014年6月8日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

入江潤一郎、腸内細菌の代謝異常症形成における意義とその治療応用の可能性、第47回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、2014年1月31日、アルカディア市ヶ谷私学会館（東京都千代田区）

入江潤一郎、代謝異常症と腸内細菌、第17回日本病態栄養学会年次学術集会、2014年1月12日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

Junichiro Irie, Gut Environment -the novel therapeutic targets of metabolic disorders-, The 33rd Annual Meeting of Japan Society for the Study of Obesity、2012年10月12日、京都

入江潤一郎、食品・薬剤による腸内環境整備、第12回日本抗加齢医学会学術総会、2012年6月22日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕(計8件)

入江潤一郎、科学評論社、糖・脂質・エネルギー代謝の司令塔としての消化管、2014、374-379

入江潤一郎、北隆館、腸管 microbiome と疾患、2014、750-754

入江潤一郎、伊藤裕、南江堂、内科疾患 最新の治療 明日への指針、2014、1531-1532

入江潤一郎、伊藤裕、ライフメディコム社、糖尿病 深化する疾患コンセプト、2014、937-942

入江潤一郎、伊藤裕、羊土社、臓器間ネットワークによるエネルギー代謝制御、2013、695-700

入江潤一郎、医歯薬出版社、糖尿病の療養指導 Q&A、2013、97-100

入江潤一郎、伊藤裕、最新医学社、肥満症：

病態・診断・治療、2013、110-117

入江潤一郎、伊藤裕、日本心臓財団、臓器連関からみた心血管病発症のメカニズム、2012、1498-1503

〔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

<http://www.keio-emn.jp/research/08.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

入江潤一郎 (IRIE JUNICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70306687

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

渡辺 光博 (MITSUHIRO WATANABE)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科  
・教授

研究者番号：10450842