

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860338

研究課題名(和文) インスリン抵抗性発症における腸管マクロファージFoxo1の機能的解析

研究課題名(英文) Physiological roles of intestinal macrophage Foxo1 in HFD-induced insulin resistance

研究代表者

川野 義長 (Kawano, Yoshinaga)

慶應義塾大学・医学部・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)：当該研究者は、肥満・高脂肪食負荷に伴い大腸で慢性炎症が生じる事に着目し、腸管マクロファージを質的・量的に変化させるモデルとして腸管上皮特異的タモキシフェン誘導型Ccl2欠損マウスとマクロファージ特異的Ccr2欠損マウス、マクロファージ特異的Foxo1活性化マウスを作製した。腸管上皮特異的にCcl2分泌を抑制すると、マクロファージFoxo1の下流遺伝子であるCcr2陽性腸管マクロファージ浸潤が抑制され、インスリン感受性と耐糖能が改善した。以上の結果より高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性発症機序において腸管上皮Ccl2-マクロファージCcr2を介した腸管の慢性炎症が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the pathophysiological role of colonic macrophage, We generated intestinal epithelial cell-specific tamoxifen inducible Ccl2 knockout mice (Vil-Ccl2KO), Macrophage specific Ccr2 knockout mice(M-Ccr2KO)and Macrophage specific PDK1 knockout mice(Foxo1 activation model). Foxo1 in macrophage directly induced Ccr2 expression(Kawano Y. et al, Diabetes. 2012) Vil-Ccl2KO and M-Ccr2KO exhibit significantly improved glucose tolerance and insulin sensitivity compared to control mice under 12-week-HFD. Deletion of Ccl2 in intestinal epithelial cell reduced infiltration of colonic macrophage, leading to amelioration of HFD-induced intestinal barrier dysfunction, endotoxemia and chronic inflammation in adipose tissue. These data indicate that inhibition pro-inflammatory macrophages infiltration in colon prevents from HFD-induced insulin resistance.

研究分野：内分泌代謝内科

キーワード：インスリン抵抗性 腸管免疫 肥満

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)「インスリン抵抗性発症早期に重要な臓器として食事や腸内細菌と最初に接する腸管に着目」

近年、脂肪組織の慢性炎症を引き起こす上流メカニズムの1つに、腸内細菌が注目されている。即ちマウス腸内細菌叢が高脂肪食負荷早期で変化し、それ自体が肥満および脂肪組織の慢性炎症を惹起するという報告(Cani PD, et al. *Diabetes* 56: 1761-72, 20073)や、腸管自然免疫の病原体センサーである Toll-like receptor (TLR)5 のノックアウトマウスで腸内細菌叢が変化して、メタボリックシンドロームの表現型を呈するという報告があり(Vijay-Kumar M et al. *Science* 9 : 228-31, 2010 4)、腸管の自然免疫とメタボリックシンドロームの関連性が注目され始めている。腸内細菌が注目される一方で、宿主側の腸管免疫のインスリン抵抗性発症に果たす役割は不明な点が多い。大学院博士課程在学中後半に行った検討で、高脂肪食負荷 C57Bl6J マウスを用いて腸管免疫の変化を検討すると、高脂肪食 4 週という早期の段階で、炎症の指標である腸管の長さが肉眼的に短縮し、大腸への炎症性マクロファージ浸潤を認め、マクロファージ誘導ケモカイン Ccl2, Ccl2 受容体 Ccr2 の発現が有意に増加し、腸管マクロファージがインスリン抵抗性発症早期において何らかの役割を果たす可能性が示唆された。

### (2)「脂肪浸潤マクロファージ Foxo1 がインスリン抵抗性に関与する」

私は大学院博士課程在学中に、脂肪組織マクロファージ Foxo1 のインスリン抵抗性発症機序における病態生理学的役割を研究してきた。Foxo1 を核内移行させ過剰に活性化させるモデルとしてマクロファージ特異的 Pdk1 欠損マウス(PDK1LysM)を作製・解析し、脂肪浸潤マクロファージ Foxo1 が通常食飼育中の定常状態より核内に移行して活性化すると Ccr2 を直接誘導することで脂肪組織の慢性炎症を惹起する事を報告してきた。(Kawano Y et al, 2012, *Diabetes*。腸管マクロファージを質的・量的に変化させるモデルとして、マクロファージ特異的 PDK1/Foxo1 遺伝子改変マウスを用いて、代謝表現型への影響を検討する。

## 2. 研究の目的

高脂肪食負荷インスリン抵抗性発症機序における腸管の慢性炎症の役割を、特に腸管マクロファージ、鍵分子としてマクロファージ誘導因子 Ccl2/Ccr2、マクロファージ Foxo1 に着目してその病態生理学的役割を検討する

## 3. 研究の方法

### (1)高脂肪食負荷におけるマクロファージ

### 特異的 Ccr2 欠損マウス(M-Ccr2KO)の検討

### (2)高脂肪食負荷における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)の検討

### (3)マクロファージ特異的 PDK1/Foxo1 遺伝子改変マウス

高脂肪食負荷下における腸管マクロファージの浸潤を抑制するモデルとして、上記 2 つのマウスを作製し、代謝表現型、腸管の慢性炎症、全身のインスリン感受性臓器への影響を検討した。

#### 代謝表現型

体重測定、摂餌量測定、腹腔内ブドウ糖負荷試験、腹腔内インスリン負荷試験、脂質、血圧、脂肪肝の有無、脂肪重量、肝重量を測定

#### 腸管の慢性炎症への影響の検討

1)FACS 解析を用いて腸管マクロファージ F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> の population および腸管マクロファージ由来サイトカイン(IL1, IL18, TNF)の評価を行う

2)Real time PCR 法を用いて、マクロファージ・炎症性サイトカイン関連の遺伝子発現を評価する

3)HE 染色・各種免疫抗体を用いた免疫蛍光組織染色による組織学的所見で「腸管の長さの短縮」「盲腸重量」などの肉眼的所見や、「陰窩・絨毛の高さの短縮」「杯細胞の縮小」等の慢性炎症の程度を評価する

#### インスリン感受性の原因臓器の同定

インスリン負荷下における脂肪組織、肝臓、骨格筋における Akt リン酸化を western blotting 法で評価する

脂肪組織、肝臓、骨格筋における免疫学的評価

腸管特異的に高脂肪食負荷に伴う炎症性マクロファージ浸潤を抑制した際の、脂肪組織、肝臓、骨格筋におけるマクロファージプロファイルの変化を検討する

腸管免疫が全身のインスリン感受性を調節するメカニズムの検討

近年、高脂肪食負荷に伴い腸内細菌叢の変化、門脈内炎症性サイトカインの増加、腸管バリア障害、高 LPS 血症等が起こる事が報告されており、下記項目を検討する。

1)門脈内の炎症性サイトカイン(IL1, IL18, TNF)濃度測定(ELISA)

2)腸管バリア蛋白(Claudin1)、門脈内 LPS 濃度測定(ELISA)

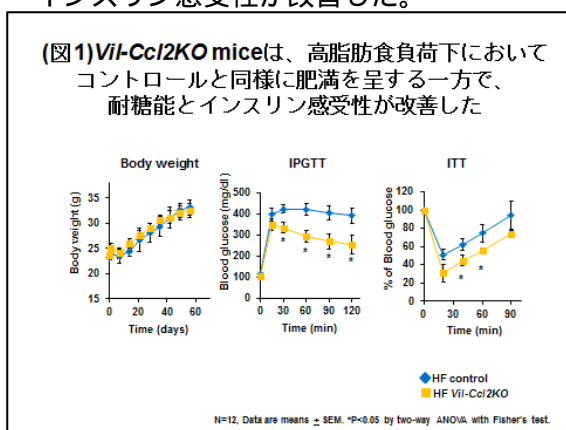
3)腸内細菌叢の解析(16s-rRNA)

## 4. 研究成果

当該研究者はこれまでの検討で、高脂肪食 4 週マウス大腸において、炎症性マクロファージ (F4/80+CD11b+Ly6c+CD11c<sup>+</sup>) が大腸に浸潤し慢性炎症が生じる事を見出した。また腸管上皮においてマクロファージ誘導ケモカイン Ccl2 の発現とその受容体 Ccr2 の発現が増加していたことに着目し、大腸マクロファージ浸潤を抑制する目的で、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*) とマクロファージ特異的 Ccr2 欠損マウス (*M-Ccr2KO*) を作製・解析した。

### (1) *Vil-Ccl2KO* の代謝表現型解析

*Vil-Ccl2KO* は、高脂肪食負荷下においてコントロールと比較し、体重に差異は認めず同様に肥満するにも関わらず、耐糖能・インスリン感受性が改善した。



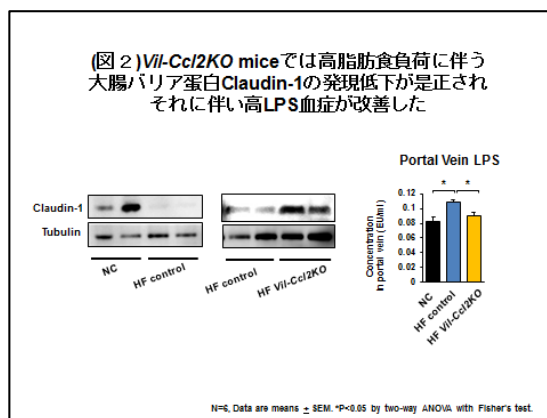
(図 1: *Vil-Ccl2KO* の代謝表現型)

高脂肪食負荷 *Vil-Ccl2KO* において、インスリン投与下における Akt リン酸化を Western Blotting で評価したところ、コントロールマウスと比較して脂肪組織と肝臓で Akt リン酸化の有意な増加を認め、同臓器でインスリン感受性が改善している可能性が示唆された。

高脂肪食負荷 *Vil-Ccl2KO* 大腸においては、コントロールと比較して、マクロファージマーカー F4/80 の遺伝子発現の低下、腸管 Inflammasome 蛋白 ASC 活性の低下を認め、腸管の慢性炎症の是正が示唆された。

腸管の慢性炎症と末梢のインスリン感受性を結ぶメカニズムとして、腸管バリア機能・門脈中の炎症性サイトカイン濃度・LPS 濃度、腸内細菌に関して検討を行った。高脂肪食負荷 *Vil-Ccl2KO* 大腸において、コントロールと比較して腸管バリア蛋白 Claudin-1 の発現が有意に改善しており、それに伴い門脈内 LPS 濃度が有意に低下しており、インスリン感受性改善の一因と考えられた (図 2) また、高脂肪食負荷 *Vil-Ccl2KO* 大腸において、コントロールと比較して炎症性サイトカイン IL-18 の発現が低下しており、それに伴い門脈内 IL-18

濃度が有意に低下しており、インスリン感受性改善の一因と考えられた



### (2) *M-Ccr2KO* の代謝表現型解析

*M-Ccr2KO* は、高脂肪食負荷下においてコントロールと比較し、体重に差異は認めず同様に肥満するにも関わらず、耐糖能・インスリン感受性が改善した。同マウスは、インスリン感受性が改善した高脂肪食 10 週においては、*Vil-Ccl2KO* 同様、腸管マクロファージの浸潤低下を認めたが、脂肪組織と肝臓のマクロファージプロファイルに有意な差異を認めなかった。高脂肪食負荷 *M-Ccr2KO* では *Vil-Ccl2KO* 同様、コントロールと比較して、腸管バリア蛋白 Claudin-1 の発現増加、門脈内 LPS 濃度低下、門脈内 IL-18 濃度低下を認めた。

以上の結果より、高脂肪食負荷に伴う大腸への炎症性マクロファージの浸潤を抑制し、腸管の慢性炎症を制御する事で、全身のインスリン感受性が改善する可能性が示唆された (第 35 回日本肥満学会若手研究奨励賞受賞、第 88 回日本内分泌学会若手研究奨励賞受賞、**Cell Metabolism, under revise**) また同論文にて、Ccl2 以外にも高脂肪食負荷大腸で増加するマクロファージ誘導ケモカインとして **Ccl1, Ccl7** を同定しており、それらに関しても腸管上皮特異的 Ccl1/Ccl7KO マウスを作製し、糖・エネルギー代謝への影響を検討していく予定である。

### (3) マクロファージ特異的 PDK1 欠損マウスの代謝表現型解析

Foxo1 核内移行 (活性化) モデルであるマクロファージ特異的 PDK1 欠損マウスは、通常食下において、コントロールと比較して体重に差異は認めないが耐糖能が有意に悪化する。同マウスにおける腸管マクロファージ Foxo1 が活性化し、Ccr2 の発現誘導を介して腸管の慢性炎症が惹起される可能性を想定して検討を行った。マクロファージ特異的 PDK1 欠損マウスはコントロールと比較し、腸管炎症を示唆する所見である腸管の長さには有意な差は認めず、マク

ロファージ関連の遺伝子発現 *F4/80*, *CD68*, *TNFA*, *IL1b*, *Ccr2* に関してもいずれも有意な変化は認めなかった。マクロファージ Foxo1 は腸管においては有意な表現型を呈さなかった。

既報でマクロファージ Foxo 欠損マウスは腸炎を呈さない一方で (Kyoichiro T et al, Circulation research, 2013)、T 細胞特異的 Foxo1/Foxo3 欠損マウスでは Treg 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た。しかし、高脂肪食負荷における腸管 T 細胞 Foxo の機能解析の報告はなく、その役割は不明である。現在我々は、T 細胞特異的 Foxo1<sup>-</sup>/Foxo3<sup>+</sup> マウスを作製し代謝表現型を解析中である。同マウスは高脂肪食負荷下においてコントロールと比較し、体重が有意に低下し、耐糖能・インスリン感受性が有意に改善した。同マウスのパイエル板において、コントロールと比較して IL4, 13 の発現が有意に増加しており、腸管 T 細胞 Foxo1/3 の活性調節により、腸管免疫に影響を与え、全身の糖代謝を改善させる可能性が示唆され、今後糖・エネルギー代謝における腸管 T 細胞 Foxo の機能解析を行うため、遺伝子改変マウスを用いた研究を進めていく。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

川野義長, 渡辺信之, 中江淳, 菊地徹洋, 楯谷三四, 田守義和, Eric G. pamer, 小野寺雅史, 伊藤裕. 高脂肪食インスリン抵抗性発症機序における腸管上皮 *Ccl2* の役割. 第 89 回日本内分泌学会学術総会. 2016 年 4 月 22 日(口演、査読有、国立京都国際会館、京都府京都市)

川野義長, 中江淳, 渡辺信之, 菊地徹洋, 楯谷三四郎, 田守義和, Eric G. pamer, 小野寺雅史, 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 27 回分子糖尿病学シンポジウム. 2015 年 12 月 5 日 (口演、査読有、丸ビルホール&コンファレンススクエア、東京都千代田区)

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. 高脂肪食負荷において腸管マクロファージによる腸管慢性炎症がインスリン感受性を悪化させる. 第 58 回日本糖尿病学会, 2015 年 5 月 21 日 (口演、査読有、海峡メッセ下関、山口県下関市)

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. 高脂肪食負荷における腸管マクロファージによる慢性炎症は、インスリン感受性を悪化させる. 第 88 回日本内分泌学会, 2015 年 4 月 23 日(口演、査読有、ホテルニューオータニ東京、東京都千代田区)

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. 高脂肪食負荷における腸管マクロファージによる慢性炎症は、インスリン感受性を悪化させる. 2014 年 10 月 24 日(口演、査読有、フェニックスシーガイアリゾートコンベンションセンター、宮崎県宮崎市)

川野義長, 中江淳, 菊地徹洋, 小谷紀子, 松崎素子, 大平理沙, 後藤伸子, 近藤文子, 伊藤裕. 高脂肪食負荷による腸管慢性炎症におけるマクロファージ Foxo1 の役割. 2014 年 5 月 22 日(口演、査読有、大阪国際会議場、大阪府大阪市)

川野義長, 中江淳, 小谷紀子, 菊地徹洋, 松崎素子, 大平理沙, 後藤伸子, 茂田文子, 伊藤裕. 高脂肪食負荷マウスでは脂肪組織より腸管マクロファージは早期に活性化する. 2014 年 4 月 26 日(口演、査読有、福岡国際会議場、福岡県福岡市)

#### 【受賞歴】

第 35 回(2014 年) 日本肥満学会 若手研究奨励賞受賞

第 88 回(2015 年) 日本内分泌学会 若手研究奨励賞受賞

第 1 回糖尿病学会若手助成

Banyu Foundation Research Grant2015

〔図書〕(計 1 件)

中江淳・川野義長, 伊藤裕. Foxo1 の慢性炎症における役割. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 代謝・内分泌系の慢性炎症, 109-113, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

#### 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・助教

研究者番号:80571463

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし