

183. 摂食時の腸管免疫の正常応答による代謝調節機構の解明

戸田 郷太郎

東京大学 大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科

Key words : 肥満症, 糖代謝, 免疫細胞, 腸内細菌, インスリン

結 言

肥満は2型糖尿病、冠動脈疾患、悪性腫瘍をはじめとした患者のQOLを低下させる疾患のリスクを上昇させるため、肥満に対する対策は重要な課題である。さらに食事・運動という代謝に影響を与えるとこれまでも考えられてきた環境因子、家庭や職場のストレスを含む社会環境など環境に影響を受けるため、肥満への対策を進めることにより多くの問題を解決する糸口になることも期待できる。免疫系は感染症における病原体だけでなく、栄養素など体外に存在する因子に対し細胞内シグナルを介して反応することができ、サイトカインなどの因子を放出することにより恒常性へ影響を与えることができると考えられる。肥満の病態形成でも免疫機能の一つである炎症が病態を促進しているということは多くの報告から明らかになっている。一方で正常な状態で免疫がいかに食事などの環境因子に反応し、正常な代謝を維持するかという点に関して私たちはこれまで非肥満状態で食後の腸内細菌由来Lipopolysaccharide (LPS)の血中濃度上昇がインスリンとともにマクロファージでIL-10を誘導し、食後の肝糖新生を正常に抑制することを明らかにしてきた[1]。この免疫の正常反応は肥満したマウスでは障害されており、食後の反応が肥満時に破綻するメカニズムを明らかにすることにより、免疫の食事への正常反応を維持する治療やその異常を検出するバイオマーカーの開発につながりうると考えられた。本研究は肥満・糖尿病の環境因子に着目した治療を、正常時の免疫細胞の機能を維持することにより行うことを目標におき、外界への腸内環境、免疫の正常反応と肥満での変化を解析した。

方 法

小腸は消化管の中で食物が早期に流入する上、リンパ組織であるパイエル板[2]に免疫細胞が多数存在すると考えられる。本研究では摂食時の小腸免疫細胞の正常反応を検討するために、絶食時、摂食後に1細胞レベルでパイエル板の遺伝子発現を検討した。摂食後早期の変化をより鋭敏に検出するために絶食、摂食時の小腸を摘出後パイエル板の細胞懸濁液を作製し、まずbulk RNA-seqを行い、その後変動が大きいと考えられた遺伝子を発現する細胞集団を明らかにするためにsingle cell RNA-seq (scRNA-seq)により摂食時に変動する細胞集団、遺伝子発現変化、また肥満マウスモデルでのこれらの変化を検出することを目指した。また腸内環境の摂食時の変化を明らかにするために小腸上皮を単離しRT-PCRにより遺伝子発現を解析した。さらに、腸内細菌の中で酪酸産生菌が肥満、糖尿病に対してprotectiveに作用すると報告されていることから[3]、これらの遺伝子発現profileについて酪酸存在下、非存在下の初代培養マクロファージ[4]をモデルとして検証した。

結 果

Bulk RNA-seqによる検討で小腸パイエル板では食後、protein folding、proteasomal degradationで役割を果たす[5]、Hsp70の発現が増加し、scRNA-seqではHsp70は骨髄系細胞、B細胞、T細胞で食後の発現が確認された。また空間的トランスクリプトーム解析で、非肥満状態で絶食時および食後にパイエル板でupregulateされている遺伝子を列挙した上でパスウェイ解析を行うと、NF- κ Bに関連する遺伝子発現変化が検出された。RT-PCRで同様のサン

プルを解析すると、IL-1 β 、IL-10 などいずれも NF- κ B により発現誘導される因子の発現が増強していた。小腸ではバリア関連遺伝子である claudin1、occludin の発現が食後低下し (図 1)、肥満状態と抗菌薬により腸内細菌を殺菌した状態では発現が低下するとともに食後の反応が障害されていた。初代培養マクロファージにおける LPS による I κ B α 蛋白の分解はインスリンと共に 30~60 分刺激する条件で亢進し (図 2)、インスリン、LPS により活性化されるシグナルが合流する node のうちのの一つであると考えられた。酪酸の存在下で Hsp70 の発現は増加し、LPS とインスリンによる I κ B α 蛋白の分解が亢進したが、同じ条件で siRNA により Hsp70 を knockdown すると I κ B α の蛋白量が増加するとともに LPS とインスリンによる分解が障害された。

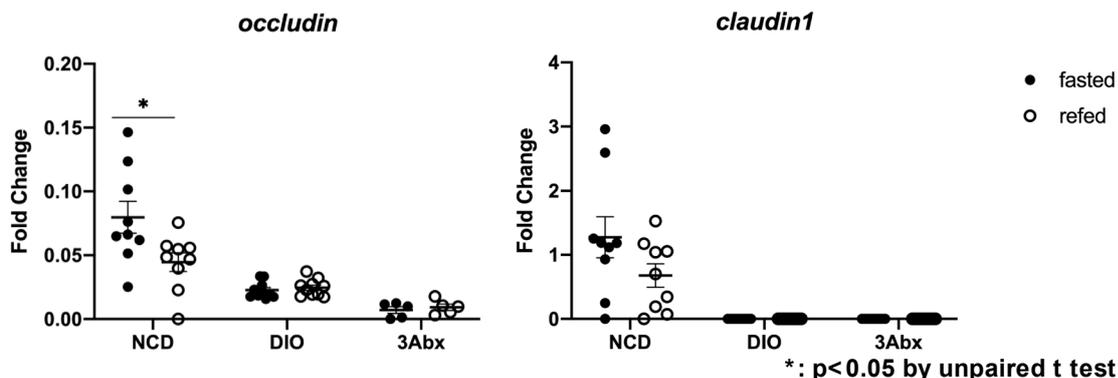


図 1. 絶食、摂食時の小腸でのバリア遺伝子の発現

絶食時と接触後 1 時間における小腸壁の遺伝子発現解析 (RT-PCR)。
 NCD: 非肥満マウス (通常食摂取)、DIO: 肥満マウス (高脂肪食 4 週間摂取)、
 3Abx: 抗菌薬 (AMPC、VCM、Neomycin) 4 週間経口投与。

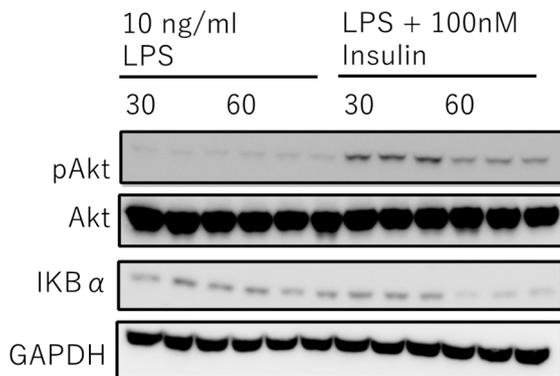


図 2. 骨髄由来マクロファージでの I κ B α 蛋白の分解

BMDM を 3 h serum starve 後、10 ng/ml LPS/100 nM insulin : 30、60 min で刺激した。インスリンにより 60min にかけて I κ B α の degradation が更新した。

考 察

NF- κ B の活性化は腸管免疫の正常な応答と考えられ、肥満状態や腸内細菌を殺菌した状態では障害されていた。肥満状態では短鎖脂肪酸により促進される I κ B α 蛋白の Hsp70 依存的な分解および NF- κ B の活性化が障害されることにより免疫細胞の機能異常をきたす可能性がある。また小腸のバリア遺伝子の正常な発現は肥満状態では障害されており、腸管内に含まれる腸内細菌由来物質などの生体外物質が異常に流入することにより肥満時の異常が形成される

可能性も考えられた。NF- κ Bのインスリン依存的な活性化経路の中で、肥満状態で正常機能を障害する因子の同定と、例えば酪酸の作用を強化するような介入の治療としての有用性の検討は今後進める必要がある。そのような検討が進むことにより、肥満による病的変化に抵抗できる免疫細胞による新たな肥満治療が開発できる可能性がある。

共同研究者

本研究の空間的トランスクリプトーム解析は、国立がん研究センター研究所の岡本康司先生との共同研究で行った。

文 献

- 1) Toda G, Soeda K, Okazaki Y, Kobayashi N, Masuda Y, Arakawa N, et al. Insulin- and Lipopolysaccharide-Mediated Signaling in Adipose Tissue Macrophages Regulates Postprandial Glycemia through Akt-mTOR Activation. *Molecular cell*. 2020;79(1):43-53.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.033.
- 2) Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, et al. Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses. *Cell*. 2019;178(5):1072-87.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.047.
- 3) Agus A, Clement K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*. 2020. Epub 2020/12/05. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323071. PubMed PMID: 33272977.
- 4) Toda G, Yamauchi T, Kadowaki T, Ueki K. Preparation and culture of bone marrow-derived macrophages from mice for functional analysis. *STAR Protocols*. 2021;2(1). doi: 10.1016/j.xpro.2020.100246.
- 5) Fernandez-Fernandez MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L, Valpuesta JM. Hsp70 - a master regulator in protein degradation. *FEBS letters*. 2017;591(17):2648-60. Epub 2017/07/12. doi: 10.1002/1873-3468.12751. PubMed PMID: 28696498.