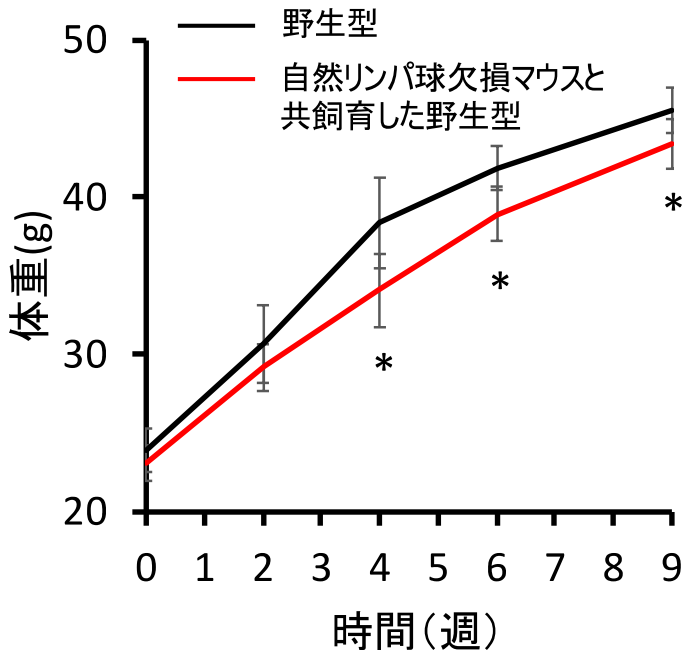
144　肥満における腸内細菌と自然リンパ球の相互作用解析	佐々木　崇晴

【目的】我々はこれまでに、近年新しく発見されたリンパ球「自然リンパ球（Innate lymphoid cells：ILCs）」が高脂肪食による肥満の誘導に関与することを見出した。しかし、小腸の自然リンパ球がどのように肥満を誘導するのか、その機構は不明である。これに対し近年、肥満の誘導やインスリン抵抗性の発症には腸内細菌が関与することが知られるようになったが、腸内細菌による肥満の制御機構についても不明である。そこで本研究では、自然リンパ球による肥満の誘導における腸内細菌の関与について検証し、関与する菌の同定を目指すことにした。

【方法】自然リンパ球による肥満、インスリン抵抗性の誘導に腸内細菌が関与するか調べるため、自然リンパ球欠損マウス（Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウス）を野生型マウスと同じケージ内で飼育して高脂肪食負荷を行い、体重を測定した。高脂肪食負荷マウスに対し、インスリンを投与して血糖値の測定を行う（インスリン感受性試験）ことによってインスリン抵抗性を評価した。これらのマウスの糞便と小腸内容物から DNA を抽出して 16SrRNA 遺伝子可変領域のシーケンシングによる菌叢解析を行い、マウスの表現型に関連する腸内細菌を探索した。

【結果】自然リンパ球欠損マウスと共に飼育した野生型マウスでは、単独で飼育した野生型マウスと比較して高脂肪食による体重増加が改善され、脂肪組織重量の減少が見られた。インスリン抵抗性試験でも有意な血糖値減少が見られたとともに、肝臓の組織標本では脂肪滴蓄積の減少が観察された。したがって、自然リンパ球欠損マウスの腸内細菌は、肥満とそれに伴うインスリン抵抗性を改善することが分かった。これらのマウス糞便を採取して菌叢解析を行った結果、自然リンパ球欠損マウスと共に飼育した野生型マウスの糞便において Bifidobacterium 属の細菌が増加していることがわかった。以上から、自然リンパ球は Bifidobacterium 属の細菌の排除に働き、これが肥満の誘導やインスリン抵抗性の悪化に関与する可能性が考えられた。今後は自然リンパ球がどのように Bifidobacterium の定着や排除の制御に関わるのかについて検証を行っていく予定である。

自然リンパ球欠損マウスの腸内細菌は肥満抑制効果を示す



144. 肥満における腸内細菌と自然リンパ球の相互作用解析

佐々木　崇晴

理化学研究所 生命医科学研究センター 粘膜システム研究チーム

Key words：肥満，インスリン抵抗性，腸内細菌，自然リンパ球

緒　言

肥満は食事や生活環境といった環境因子のみならず、遺伝的素因などが要因となって引き起こされることが知られている。肥満は糖尿病や高血圧、高脂血症などの疾患のリスクファクターとなることが知られており、早期の介入が重要である。しかしながら、その根本的な改善・治療につながる方法は少なく、新たな治療ターゲットの発見や治療方法の開発につながる研究が求められている。

我々はこれまでの研究から、近年新しく発見されたリンパ球「自然リンパ球（Innate lymphoid cells：ILCs)」が高脂肪食による肥満の誘導に関与することを見出した［1]。自然リンパ球は T 細胞のように抗原依存的な活性化を示さず、上皮細胞などの周囲の細胞から産生されるサイトカインなどによって活性される自然免疫系のリンパ球である。自然リンパ球はインターフェロンγ（IFNγ）の産生を介して細胞内細菌感染に対する防御に働く 1 型自然リンパ球（ILC1)、インターロイキン 5（IL-5）や IL-13 の産生を介してアレルギーの発症や寄生虫感染に対する防御に働く2型自然リンパ球(ILC2)、IL-17やIL-22の産生を介して細胞外細菌感染に対する防御に働く3型自然リンパ球(ILC3)に分類される。我々は、自然リンパ球を欠損する Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスにおいて高脂肪食による肥満とそれに付随するインスリン抵抗性の改善が見られ、このマウスに小腸の ILC2 を移植すると肥満の誘導が回復すると共にインスリン抵抗性も悪化することから、小腸の ILC2 が肥満の誘導やインスリン抵抗性の発症に関与することを見出した。また、ILC3 の分化に必要な転写因子 Rorγt を欠損するマウスに高脂肪食負荷を行った実験より、小腸の ILC3 も肥満の誘導やインスリン抵抗性の発症に重要であることが示唆された［1]。しかしながら、小腸の自然リンパ球がどのように肥満を誘導するのか、その機構は不明である。

一方で近年、肥満マウスから採取した腸内細菌を無菌マウスに移植すると肥満になりやすくなることがわかった[2]。さらに、ヒトを対象とした研究においても、肥満度の異なる双生児を対象とした研究において、肥満度の大きいヒトの腸内細菌を無菌マウスに移植しても肥満が促進されることが報告された［3]。つまり、肥満の誘導やインスリン抵抗性の発症には腸内細菌が関与することが知られるようになった。しかしながら、腸内細菌がどのようにして肥満の誘導やインスリン抵抗性の発症に関与するのか、その詳細は不明である。そこで本研究では、我々が発見した現象と腸内細菌との関係性に着目し、自然リンパ球による肥満の誘導やそれに付随するインスリン抵抗性の発症に関与する可能性のある腸内細菌の同定を目指すことにした。

方　法

1. 共飼育実験

肥満に抵抗性を有する自然リンパ球欠損マウス（Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウス）と野生型マウスを離乳直後から同じケージ内で飼育し、8 週齢より高脂肪食負荷を行い体重の測定を行った。

2. インスリン感受性試験

高脂肪食負荷後 9 週目においてマウスを 4 時間絶食させた後、インスリン（0.75 mU/g 体重）を腹腔内投与して 120 分間、20 分おきに血糖値の測定を行った。

3. マウス糞便・腸管内容物における菌叢解析

高脂肪食負荷後 8 週目の腸内細菌をこれらのマウスの糞便から酵素法［4］により DNA を抽出し、16SrRNA 遺伝子可変領域を PCR により増幅、イルミナ社の MiSeq によるシーケンシングを行った。得られたデータは QIIME のパイプラインを用いて解析を行った。

結果および考察

1. 自然リンパ球欠損マウスの腸内細菌は肥満改善能を有する

自然リンパ球が腸内細菌を介して肥満やインスリン抵抗性の制御に関与する可能性について検証するため、野生型マウスを、自然リンパ球を欠損する Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと共飼育しながら高脂肪食負荷を行った。その結果、共飼育した野生型マウスでは、単独で飼育した野生型マウスと比べて有意に体重の増加が抑制された（図 1a）。また、Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと共飼育しながら高脂肪食を 12 週間与えた野生型マウスでは、単独で飼育した野生型マウスと比べ脂肪組織重量の減少も見られた（図 1b）。これらの結果から、Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスの腸内細菌は肥満改善効果を有することが示唆された。また、高脂肪食負荷 8 週目においてインスリン感受性試験を行った結果、初期血糖値は共飼育を行った野生型マウスと単独で飼育した野生型マウスとで変化がなかったが、インスリンを投与すると前者で有意に血糖値の低下が認められた（図 2）。即ち、自然リンパ球を欠損する Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスの腸内細菌は肥満のみならず、それに伴うインスリン抵抗性の改善にも働くことが分かった。以上の結果から、自然リンパ球は肥満やこれに付随するインスリン抵抗性を抑制する腸内細菌の排除を介し、これらの病態の悪化に働く可能性が示唆された。

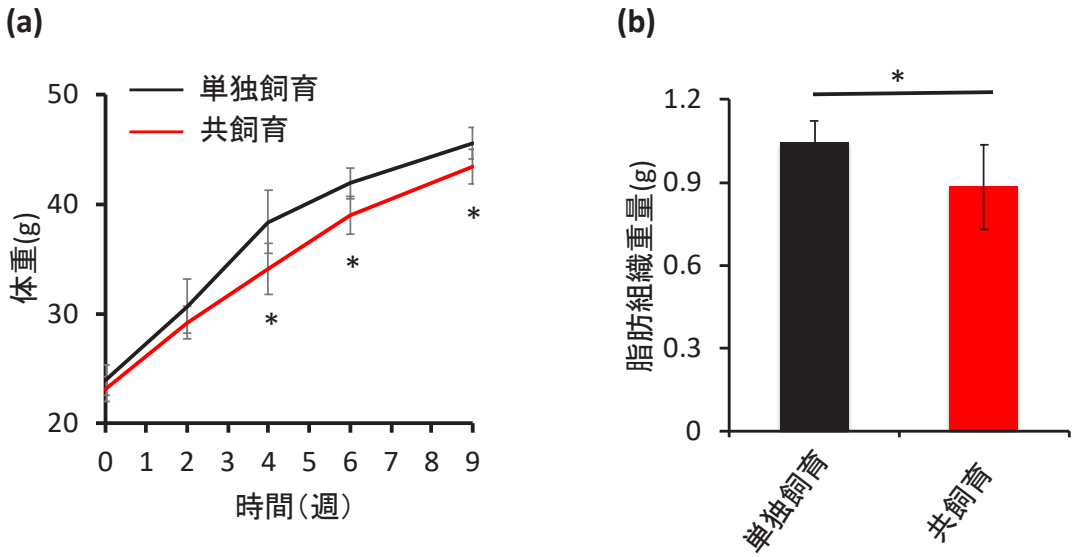


図 1. Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスの腸内細菌は肥満抑制効果を有する

a） 野生型マウスを単独で飼育、もしくは離乳直後より Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと共飼育しながら、8 週齢より高脂肪食負荷を行ったときの体重。

b） a のマウスに 12 週間高脂肪食を与えたときの腸間膜脂肪組織重量。単独飼育群、共飼育群、共に N＝6。*p＜0.05（Mann-Whitney U test）。

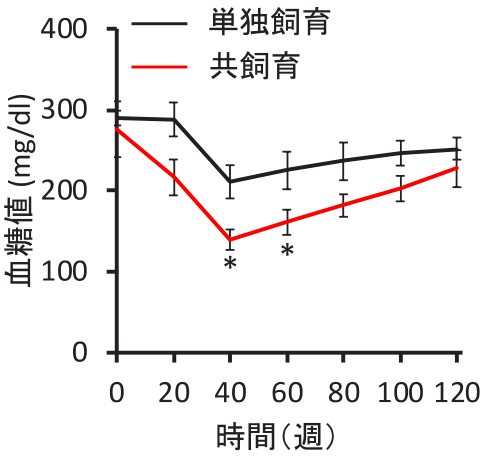


図 2. Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスの腸内細菌はインスリン抵抗性を改善する
単独で飼育、もしくは Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと共飼育しながら、8 週間高脂肪食負荷を行った野生型マウスでインスリン感受性試験を行い、血糖値を測定した。単独飼育群、共飼育群、共に N=6。 *p<0.05（Mann-Whitney U test）。

2. 共飼育実験に用いたマウスの腸内細菌の解析

1. で用いた野生型マウスの糞便を高脂肪食負荷開始後 8 週目に採取して MiSeq による菌叢解析を行った。その結果、Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと共飼育した野生型マウスでは単独飼育したマウスと比較して Bifidobacterium 属の細菌の有意な増加が見られた（図 3）。Bifidobacterim 属の腸内細菌は肥満を抑制する効果があることが知られている［5］。したがって、この結果は自然リンパ球が Bifidobacterium 属のような肥満抑制菌の腸内細菌の排除に働き、肥満の誘導に関与している可能性を示唆している。今後はこの Bifidobacterium 属の菌を単離し、実際にこの菌が肥満抑制効果を有するか検証を行う予定である。また、自然リンパ球が実際に Bifidobacterium 属の腸内細菌の定着を制御するのかという点について、Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスに自然リンパ球を再構成することにより検証を行っていきたい。

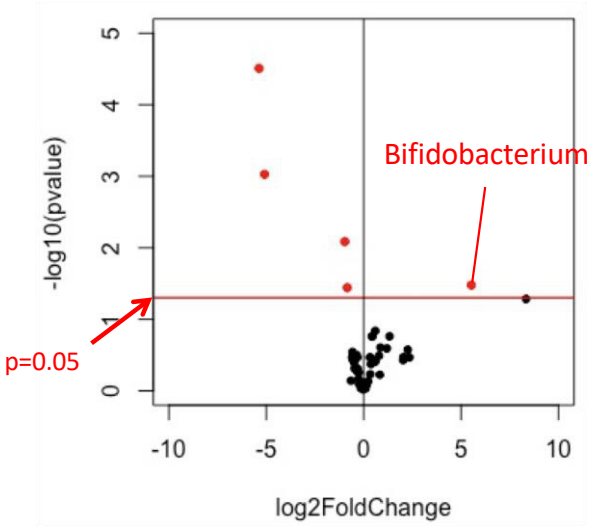


図 3. Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと共飼育した野生型マウス糞便の菌叢解析
単独で飼育、もしくは Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウスと共飼育した野生型マウスから採取した糞便の菌叢解析を行い、volcano plot を作成した。縦軸は p-value（student's t-test）、横軸は共飼育マウスの糞便中の菌の相対量を単独飼育マウス糞便の菌の相対量で除し、それぞれ対数で表示した。

共同研究者・謝辞

本研究について、理化学研究所粘膜システム研究チームの大野博司チームリーダーに大変多くの助言をいただきました。また、横浜市立大学生命医科学研究科生命医科学専攻免疫生物学研究室の平嶋愛奈さん（2017～2018 年度所属）による実験結果も掲載致しました。御礼申し上げます。

文　献

1） Sasaki T, Moro K, Kubota T, Kubota N, Kato T, Ohno H, et al. Innate Lymphoid Cells in the Induction of Obesity. Cell Rep. 2019;28(1):202-17.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.016. PubMed PMID: 31269440.

2） Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444(7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414. PubMed PMID: 17183312.

3） Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. Science. 2013;341(6150):1241214. doi: 10.1126/science.1241214. PubMed PMID: 24009397; PubMed Central PMCID: PMCPMC3829625.

4） Kim SW, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, et al. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. DNA Res. 2013;20(3):241-53. Epub 2013/04/09. doi: 10.1093/dnares/dst006. PubMed PMID: 23571675; PubMed Central PMCID: PMCPMC3686430.

5） Aoki R, Kamikado K, Suda W, Takii H, Mikami Y, Suganuma N, et al. A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. Sci Rep. 2017;7:43522. Epub 2017/03/02. doi: 10.1038/srep43522. PubMed PMID: 28252037; PubMed Central PMCID: PMCPMC5333160.