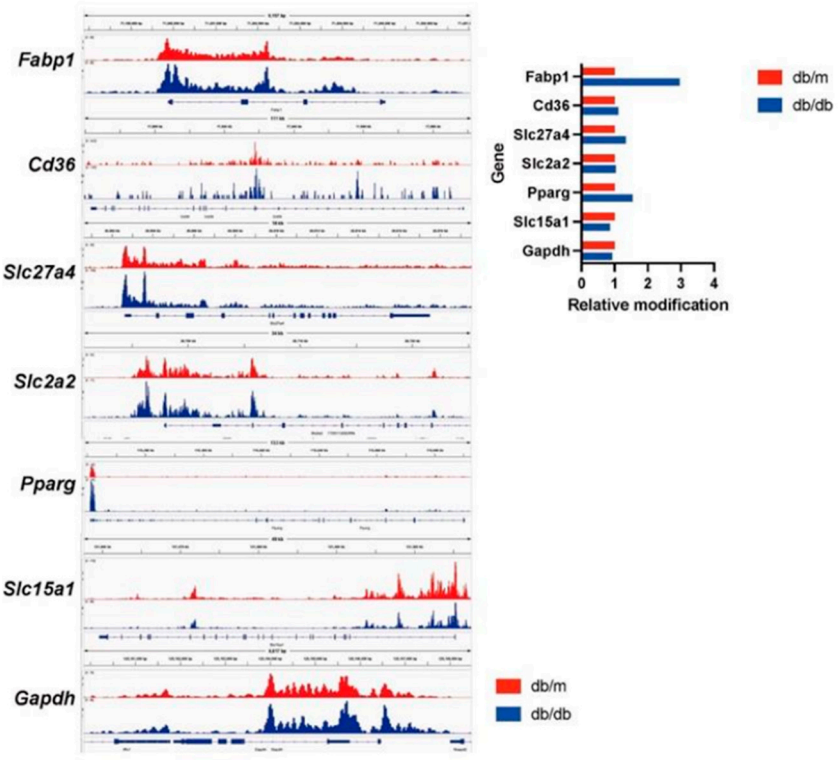
148　腸管エピゲノム変化に着目した新規糖尿病薬の開発	岡村　拓郎

【目的】2 型糖尿病をもつ人は、世界的に増加している。一方超高齢社会を迎えた我が国では、筋肉量と機能の低下が加速する進行性の全身性骨格筋障害であるサルコペニアの有病率が増加しており、サルコペニアは 2 型糖尿病の潜在的な原因であることが報告されている。そのサルコペニアに肥満を伴う病態、「サルコペニア肥満」はサルコペニアよりも予後が悪く、特に高齢者における生活習慣病の重要な病態である。本研究は、サルコペニア肥満と似た病態を呈する 2 型糖尿病モデル肥満マウス（*db/db*）マウスを用いて、統合オミクスによりサルコペニア肥満と 2 型糖尿病の病態基盤を明らかにすることを目的とした。

【方法】研究では、8 週齢の *db/m* マウスと *db/db* マウスを 8 週間飼育し、次世代シーケンサーを用いた骨格筋と小腸の遺伝子発現、血清のサイトカインアレイ、骨格筋、便、血清中の代謝産物の評価、腸内細菌叢の解析など、さまざまな解析を行った。さらに CUT&Tag 法によって小腸上皮細胞のヒストン修飾を解析した。

【結果】*db/db* マウスは有意に低い握力と高い内臓脂肪重量を示した。血清サイトカインアレイでは、*db/db* マウスにおいて VEGF-A の相対濃度が高いことが示された。骨格筋中の飽和脂肪酸濃度は有意に高かった。腸内細菌叢の解析では、*db/db* マウスでは Bacteroidetes 門が少なく、Firmicutes 門が多かった。脂質トランスポーターとグルコーストランスポーターのヒストン修飾の統合シグナルは *db/db* マウスで高く、アミノ酸トランスポーターのヒストン修飾の統合シグナルは低かった。

CUT&Tag 法による小腸上皮細胞のヒストン修飾の評価



148. 腸管エピゲノム変化に着目した新規糖尿病薬の開発

岡村　拓郎

京都府立医科大学 大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学

Key words：2 型糖尿病，マルチオミクス，腸管エピゲノム，CUT&Tag 法

緒　言

2 型糖尿病は、遺伝的要因と環境的要因の両方が影響する複雑な病因を持つ、世界的に増加しつつある健康問題である。主に加齢により筋肉量が減少して、筋力の低下、身体機能の低下をきたすサルコペニアおよび肥満は 2 型糖尿病の潜在的な原因および結果であることが報告されていることから、特に高齢者における生活習慣病の重要な病態である。本研究では過食と不活動により著明な耐糖能障害や肥満およびサルコペニアと似た病態を認める *db/db* マウスを用いて種々の実験をした結果、対照群（*db/m* マウス）と比較し *db/db* マウスでは高サイトカイン血症のほか骨格筋内の飽和脂肪酸濃度が上昇しており、腸内細菌叢の多様性が低下していた。さらに小腸上皮細胞のエピゲノム変化を確認すると、Fabp1、Cd36、Slc27a4、Pparg のヒストン修飾の統合シグナルは *db/db* マウスで高く、Slc15a1 のヒストン修飾の統合シグナルは低かった。これらの結果は過食と不活動による腸内細菌叢の改変が小腸上皮細胞のエピゲノムを変化させたことで栄養吸収動態に影響している可能性を示唆するものであった。これらの結果は腸管エピゲノム変化を介した新規糖尿病薬の創薬につながる可能性がある。

方　法

1. モデルマウス作製方法

実験方法はすべて京都府立医科大学動物実験委員会の承認を得た（承認番号：M2023-83）。本試験は無作為化と実験実施医師の盲検化を特徴とし、8 週齢の雄性 *db/m*（対照群、ヘテロマウス）および *db/db* マウス（レプチンレセプター欠損マウス）を使用した（各群 n＝6）。一晩絶食させ、16 週齢で麻酔薬（4.0 mg/kg ミダゾラム、0.3 mg/kg メデトミジン、5.0 mg/kg ブトルファノール）を投与して安楽死させた。16 週齢時に運動量をランニングホイール（MK-713：室町機械）付きケージで評価した。

2. サイトカインアレイ

RayBio Mouse Cytokine Antibody Array Kits を用いて、マウス血清中の 96 サイトカイン（n＝6）の相対発現量を、製造元のプロトコールに沿って評価した。アレイのシグナルを ImageQuant LAS 800（GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA）で撮影し、*db/m* マウスの発現シグナルを相対値 1.0 とし、評価した。

3. 血清、骨格筋および糞便中の代謝物の定量化

血清（25 μL）および小腸からの糞便、腓腹筋（15 μg）から各種メタボライトを抽出し、Agilent 7890B/7000D システムガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）を用いて評価した［1］。

4. 腸内細菌叢解析

虫垂便から QIAamp® DNA Stool Mini Kit を使用して便 DNA 抽出後、次世代シーケンサーHiSeq 2000/2500/4000 system（Illumina）を用いてショットガンメタゲノム解析を実施した［2］。

5. NON-TiE-UP による標的下での切断とタグメンテーション

単離した小腸上皮細胞を 96 ウェルプレートに播種し、一次抗体、二次抗体で標識した後、Dig-300 緩衝液、pA-Tn5 トランスポソーム、ジギトニンに反応させた。Tagmentation Buffer を含む個々の微量遠心チューブに移し、37℃でインキュベートした。タグメンテーション後、EDTA、SDS、およびプロテイナーゼ K を添加し、一連のインキュベーションおよび加温工程を経た。SPRIselect ビーズを組み込んでボルテックスし、インキュベートした後、磁気分離を行い、その後エタノールで洗浄した。乾燥後、DNA Purification Elution Buffer を加え、タグ化 DNA を含む液を回収した。シークエンシングライブラリーの PCR 増幅は、タグメンテッド DNA とインデキシングプライマーを用いて、製造元の指示に従って行った。PCR ライブラリーは一連の温度条件を経て、SPRIselect ビーズによる PCR 後のライブラリー精製とエタノール洗浄が行われた。シーケンスライブラリーは最終的に DNA Purification Elution Buffer で溶出された［3］。

結　果

1. 2 型糖尿病による骨格筋萎縮および血中サイトカイン濃度

db/db マウスでは *db/m* マウスと比較し有意な体重増加を認めた一方で、運動量は有意に低下しており（図 1A、B）、握力も低下していた（図 1C）。*db/db* マウスの VEGF-A 濃度は *db/m* マウスよりも高かったが、TNFRSF1A、CXCL4、MIP-1γ、MMP-3、VEGFR2、IGF-1、HGFR、OPN、OPG の血清濃度は低かった（図 1D）。

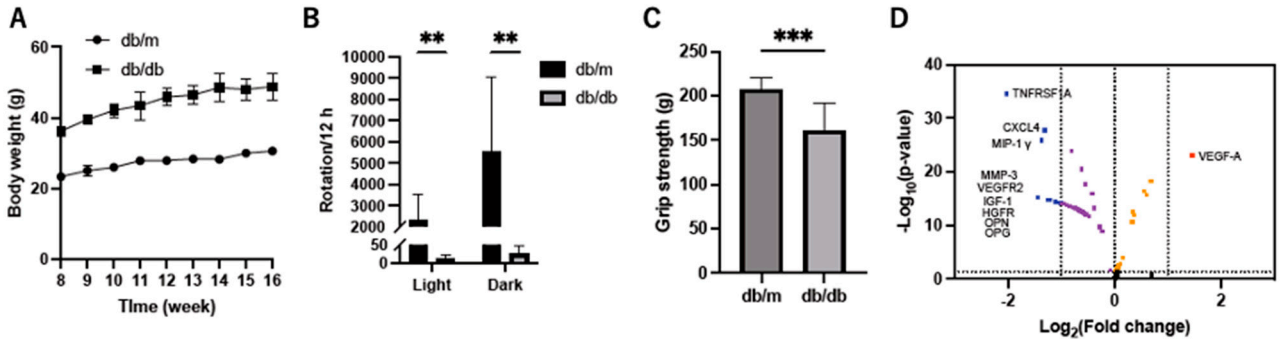


図 1. 運動量、握力の評価および血清サイトカインアレイの結果

A） 体重。

B） 運動量（Light：p=0.0017、Dark：p=0.0046）。

C） 握力（p=0.0005）。

D） 血清サイトカインアレイのボルケーノプロット。X 軸: Log_2（*db/db* マウス／*db/m* マウス比）、Y 軸：$-Log_{10}$（p 値）。

P 値は Weich's t-test により算出した。

2. 2 型糖尿病による血清、骨格筋、便中の脂肪酸濃度

db/db マウスは *db/m* マウスに比べ、血清、骨格筋、糞便中の長鎖脂肪酸濃度が高く、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸が血清、骨格筋に多く含まれていた。一方、*db/db* マウスの糞便中の飽和脂肪酸濃度は *db/m* マウスよりも低値であった。パルミトレイン酸やオレイン酸などの一価不飽和脂肪酸や飽和脂肪酸は、*db/db* マウスの血清や骨格筋で上昇したが、糞便では低値であった。多価不飽和脂肪酸については、その傾向は一貫していなかったが、*db/db* マウスの骨格筋では、*db/m* マウスと比較して EPA および DHA 濃度が低かった（表 1）。

表 1. 血清、骨格筋、糞便中の長鎖脂肪酸濃度

		Serum (μg/mL)			Skeletal muscle (μg/mg)			Feces (μg/mg)		
		db/m	*db/db*	p-value	*db/m*	*db/db*	p-value	*db/m*	*db/db*	p-value
Saturated fatty acid	Lauric acid	5.613 (2.741)	15.773 (3.380)	0.033	0.384 (0.202)	2.135 (0.302)	< 0.0001	0.490 (0.201)	0.250 (0.122)	0.032
	Myristic acid	43.901 (7.622)	68.539 (14.059)	0.045	2.264 (0.408)	4.115 (0.935)	0.085	10.111 (4.065)	4.442 (1.991)	0.012
	Palmitic acid	790.065 (132.641)	1406.625 (390.238)	0.016	36.394 (6.167)	60.751 (12.883)	0.031	126.933 (58.811)	46.218 (19.570)	0.009
	Stearic acid	167.802 (63.050)	1313.836 (276.472)	0.018	16.183 (1.107)	20.384 (2.452)	0.042	31.715 (9.314)	16.656 (6.519)	0.009
Monounsaturated fatty acid	Palmitoleic acid	284.832 (28.253)	506.330 (157.580)	0.075	11.803 (0.162)	14.375 (0.891)	0.031	44.901 (20.213)	3.174 (0.480)	0.026
	Oleic acid	449.250 (189.742)	829.398 (107.235)	0.039	130.715 (25.978)	235.127 (58.854)	0.037	20.099 (11.074)	7.643 (3.278)	< 0.0001
Polyunsaturated fatty acid	Linoleic acid	944.262 (273.000)	1688.418 (404.724)	0.058	53.147 (10.696)	173.666 (86.311)	< 0.0001	80.619 (51.679)	22.108 (17.554)	0.025
	Gamma-linolenic acid	36.567 (6.242)	54.056 (26.982)	0.467	2.680 (0.739)	4.944 (1.498)	0.063	0.159 (0.034)	0.095 (0.018)	0.006
	Alpha-linolenic acid	19.791 (8.030)	50.667 (14.983)	0.034	2.710 (1.176)	2.782 (1.098)	0.515	0.245 (0.129)	0.409 (0.173)	0.113
	Dihomo-γ-linolenic acid	24.507 (14.451)	77.634 (33.567)	0.029	4.944 (1.498)	2.680 (0.739)	0.064	0.563 (0.235)	1.081 (0.034)	0.032
	Arachidonic acid	203.391 (60.489)	618.465 (290.078)	0.019	0.631 (0.073)	0.525 (0.699)	0.108	0.660 (0.206)	0.450 (0.224)	0.122
	EPA	267.853 (38.072)	262.450 (85.631)	0.942	0.321 (0.044)	0.145 (0.008)	< 0.0001	0.651 (0.278)	1.010 (0.523)	0.169
	DHA	159.843 (49.311)	127.487 (28.989)	0.387	22.646 (4.440)	14.902 (1.337)	< 0.0001	0.603 (0.169)	0.401 (0.103)	0.045

Data are presented as means (standard deviation); P values were calculated by Welch's t-test.

3. 腸内細菌叢解析

2つのグループにおける菌叢の相対的な存在量を調査した。*db/m*マウスでは*db/db*マウスよりもBacteroidetes門の存在量が多く、Firmicutes門の存在量が少ないことが観察された（図2A、B）。また、多様性の指標であるShannon indexは*db/db*マウスで*db/m*マウスより低かった（図2C）。*db/m*マウスと*db/db*マウスの間で存在率に差異のある特定の菌叢を特定するために、LEfSeアルゴリズムを採用した。*db/db*マウスでは67の分類群が過剰発現しており（Erysipelotrichaceae科、Faecalibaculumrodentium sp. nov.、Alistipesinops sp.nov.およびRomboutsiatimonensis sp.nov.を含む）、141の菌が過少発現（Alistipes finegoldii sp. nov.、Parabacteroidesgordonii sp. nov.およびBacteroidesacidifaciens sp. nov.を含む）していた（図2D）。

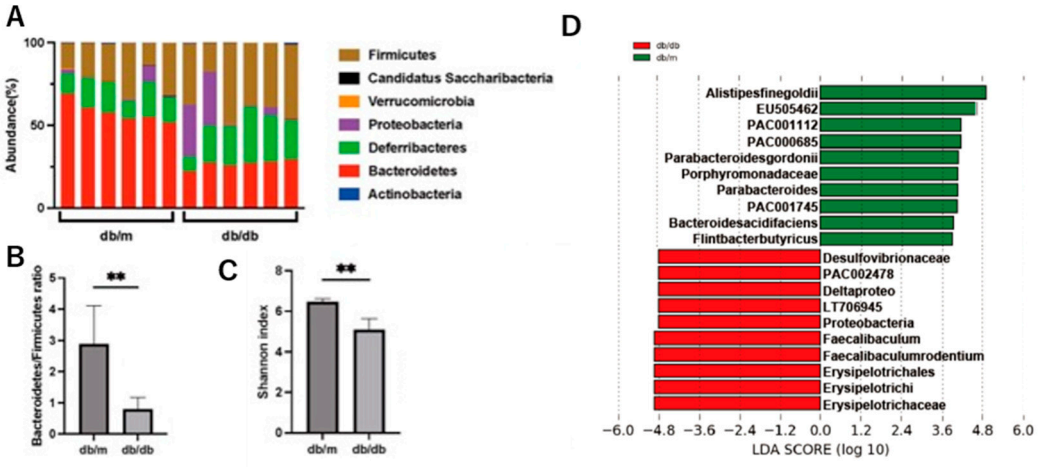


図2. 腸内細菌叢解析

A） 菌種の比率。

B） Bactroidetes/Firmicutes門比（p＝0.0026）。

C） Shannon index（p＝0.0018）。

D） LefSe解析により*db/m*マウスと*db/db*マウスの間で存在量の差が最も大きい分類群を同定した。*db/db*マウスで増えている菌種はLDAスコアがマイナス（赤）、*db/m*マウスで増えている菌種はプラス（緑）で示した。

P値はWeich's t-testにより算出した。

4. ゲノム領域における H3K9ac の分布とピークの比較解析

特定のゲノム領域におけるエピジェネティック修飾のレベルを定量的に比較するために、これらの領域にわたるヒストン修飾の統合シグナルを計算した。mRNA-seqで*db/db*群で高発現していたFabp1、Cd36、Slc27a4、Pparg のヒストン修飾の統合シグナルは*db/db*群で高く、mRNA-seqで*db/db*群で低かったSlc15a1のヒストン修飾の統合シグナルは*db/db*群で低かった（図3）。

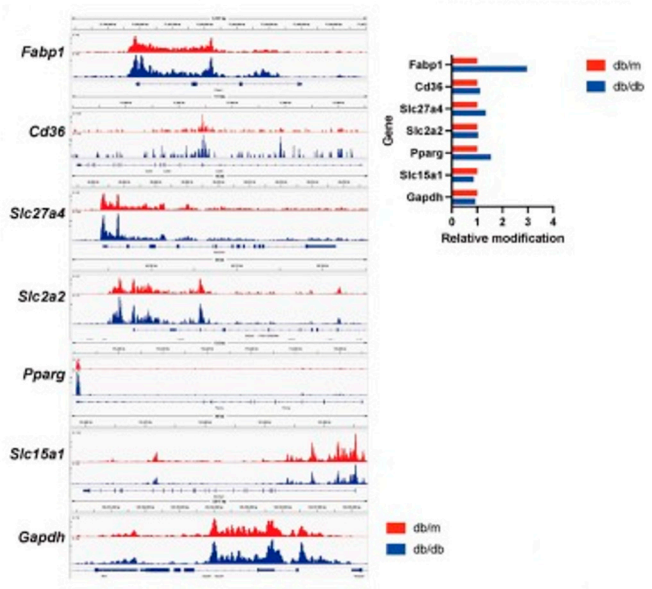


図 3. 小腸上皮細胞におけるヒストン修飾
db/m マウス（赤）と *db/db* マウス（青）の小腸上皮細胞（Fabp1、Cd36、Slc27a4、Slac2a2、Pparg、Slc15a1、Gapdh）の CUT&Tag シグナル。

考　察

本研究では、過食と不活動をもとに高度な肥満およびサルコペニアを来す *db/db* マウスを用いて、骨格筋、小腸を中心に種々の解析を実施した。骨格筋において飽和脂肪酸濃度が有意に上昇していた。飽和脂肪酸は筋管細胞において筋管径が減少し、インスリンシグナルが抑制されることが示されており、糖尿病の病態基盤の一つに骨格筋中の飽和脂肪酸濃度の上昇が寄与している可能性が示唆された。さらに脂質トランスポーターとグルコーストランスポーターのヒストン修飾の統合シグナルは *db/db* マウスで高く、アミノ酸トランスポーターのヒストン修飾の統合シグナルは低かったことから、これらの結果は腸管エピゲノム変化を介した新規糖尿病薬の創薬につながる可能性がある。

謝　辞

脂肪酸測定に際し、種々のご助言を賜りましたアイスティサイエンス株式会社の佐々野僚一氏に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Okamura T, Nakajima H, Hashimoto Y, Majima S, Senmaru T, Ushigome E, Nakanishi N, Hamaguchi M, Asano M, Yamazaki M, Takakuwa H, Fukui M. Low circulating dihomo-gamma-linolenic acid is associated with diabetic retinopathy: A cross sectional study of kamogawa-dm cohort study. Endocr J; 2021;68(4):421–428. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33361692/ PMID: 33361692

2) Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A;102(43):15545–15550. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16199517/ PMID: 16199517

3) Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nussbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Shirley XS. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). Genome Biol;9(9). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18798982/ PMID: 18798982