

Title	肥満、糖尿病関連遺伝子レプチンと炎症性腸疾患の関連性の検討
Sub Title	Analyse of leptin signal in inflammatory bowel disease
Author	筋野, 智久(Sujino, Tomohisa)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	レプチンはホルモンの一種であり、食事摂取後に脳内、筋肉、褐色脂肪細胞に働き、インスリン感受性、及び血糖の上昇抑制に役割を果たしていることが知られている。近年レプチンの受容体がT細胞上にもあることが発見され、様々な腸炎モデルにてレプチン欠損では腸炎が誘導されにくいことが示されている。レプチンシグナルの下流シグナルはSTAT3経路、mTOR/Akt経路があり、前者はTh17細胞誘導に必須であることが示されている。腸管上皮内の炎症抑制T細胞誘導においてレプチン下流のmTOR/Aktシグナルが重要であることを見出した。 Leptin is a type of hormone and is known to act on brain, muscle and brown fat cells in the brain after eating, and play a role in insulin sensitivity and suppression of blood sugar elevation. In recent years, it has been discovered that leptin receptors are also present on T cells, and it has been shown that leptin deficiency is less likely to be induced in various enteritis models. The downstream signal of leptin signal is STAT3 pathway, mTOR / Akt pathway, and the former paper has been shown to be essential for Th17 cell induction. We found that the mTOR / Akt signal downstream of leptin is important in the induction of anti-inflammatory CD4CD8aa T cells in the intestinal epithelium.
Notes	研究種目：挑戦的研究(萌芽) 研究期間：2017～2018 課題番号：17K19668 研究分野：消化器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K19668seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 元年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19668

研究課題名（和文）肥満、糖尿病関連遺伝子レプチンと炎症性腸疾患の関連性の検討

研究課題名（英文）Analyse of Leptin signal in Inflammatory bowel disease

研究代表者

筋野 智久 (Sujino, Tomohisa)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：40464862

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：レプチンはホルモンの一種であり、食事摂取後に脳内、筋肉、褐色脂肪細胞に働き、インスリン感受性、及び血糖の上昇抑制に役割を果たしていることが知られている。近年レプチンの受容体がT細胞上にもあることが発見され、様々な腸炎モデルにてレプチン欠損では腸炎が誘導されにくいことが示されている。レプチンシグナルの下流シグナルはSTAT3経路、mTOR/Akt経路があり、前者はTh17細胞誘導に必須であることが示されている。腸管上皮内の炎症抑制T細胞誘導においてレプチン下流のmTOR/Aktシグナルが重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプチンのレセプター下流のSTAT/mTORについて検討した。CD4特異的にSTAT3を上昇させるSOCS1/f1:CD4creマウスではCD4CD8aaは有意に減少しない。レプチンシグナル下流におけるmTORに着目して腸管上皮内CD4CD8aa細胞の分化誘導との関連性を検討する。mTORシグナルは細胞内代謝とくに解糖系に必要な分子であり、mTORが活性化することでTh17細胞に分化することが知られている。近年細胞の分化増殖に代謝機構が重要視されており、細胞内の代謝調節という切り口から腸管上皮内の細胞の分化誘導機能を解明することで炎症性腸疾患の病態解明、治療方法を確立できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Leptin is a type of hormone and is known to act on brain, muscle and brown fat cells in the brain after eating, and play a role in insulin sensitivity and suppression of blood sugar elevation. In recent years, it has been discovered that leptin receptors are also present on T cells, and it has been shown that leptin deficiency is less likely to be induced in various enteritis models. The downstream signal of leptin signal is STAT3 pathway, mTOR / Akt pathway, and the former paper has been shown to be essential for Th17 cell induction. We found that the mTOR / Akt signal downstream of leptin is important in the induction of anti-inflammatory CD4CD8aa T cells in the intestinal epithelium.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は慢性消化管炎症をきたす疾患であり、本邦を含むアジア諸国でも増加の一途を辿っている。炎症性腸疾患の発症原因は未だ不明であるが、腸管粘膜に存在する免疫細胞、特に T 細胞の過剰な活性化が疾患の引き金になっていると考えられている。食事の欧米化は炎症性腸疾患患者の増加の一因であると考えられているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。腸管粘膜には炎症惹起に関わる helper T 細胞と炎症抑制に関わる制御性 T 細胞が存在しており、これら相反する性質を有する T 細胞のバランスが腸管免疫の恒常性に重要である。近年、研究代表者らは腸管上皮間に存在し、炎症抑制的に働く CD4CD8 α 陽性 T (CD4_{IEL}) 細胞を同定し、その分化制御機構を明らかにした (Sujino T et al. Science 2016)。そこで、脂肪関連遺伝子レプチンと腸管上皮内リンパ球の免疫応答について検討した。

2. 研究の目的

腸管は大きく粘膜固有層 (lamina propria) と粘膜上皮 (epithelial reasion) に大別され、腸管内における T 細胞も 2 つの部分にそれぞれ存在する。前者を lamina propria lymphocyte (LPL)、後者を intra-epithelial lymphocyte (IEL) を大別される。さらに T 細胞の中には炎症性惹起性の T-helper (Th) 1 細胞、炎症抑制性の制御性 T 細胞 (Treg) が存在しており、10 年ほど前より Th17 細胞が見つかっている。研究代表者はこれまで、腸管の炎症には、Th17/Th1 細胞が腸管炎症誘導の根幹的役割を果たしている事を報告した (Sujino T. Gastroenterology 2011)。これまでの研究で、IEL は誘導性腸炎に対し抑制的に働くことが報告されているが (Edelblum KL. Gastroenterology 2015)、IEL 内には Foxp3 を発現する制御性 T 細胞 (peripheral Treg; pTreg) は少数であり、pTreg 以外の細胞サブセットが炎症抑制能に寄与していると考えられる。IEL 分画内には CD4CD8 aa (CD4_{IEL}) T 細胞といった粘膜固有層とは全く異なる細胞集団が存在し、近年 CD4_{IEL} 細胞は潰瘍性大腸炎、クローン病において減少していることが知られている (Sarrabayrouse G. Plos Path. 2015)。研究代表者らは近年、CD4_{IEL}の一部が腸内細菌依存的に粘膜固有層に存在する Foxp3⁺ pTreg から分化し CD4_{IEL}は腸炎において抑制性の機能をもち、腸管恒常性維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした(Sujino T. Science. 2016)。

レプチンはホルモン的一种であり、食事摂取後に脳内、筋肉、褐色脂肪細胞に働き、インスリン感受性、及び血糖の上昇抑制に役割を果たしていることが知られている。近年レプチンの受容体が T 細胞上にもあることが発見され、様々な腸炎モデルにてレプチン欠損では腸炎が誘導されにくいことが示されている。さらにそのメカニズムとして Th1、Th17 の抑制、Treg の増加という報告がなされている。しかし、すべて大腸の粘膜固有層内での反応しか見ておらず、食事摂取後に糖が吸収される小腸においては解析がされていないのが現状である。そこで各種 レプチンシグナル欠損マウスモデル (ob/ob, db/db マウス) における CD4 T 細胞の分化、維持を検討し、レプチンと腸管内の T 細胞の関連性を検討する。

3. 研究の方法

(1) レプチンシグナルにおける IEL, LPL 分画の探索

レプチン受容体欠損マウスである db/db マウス及び、レプチン欠損マウスである ob/ob マウスの小腸 IEL、LPL 分画を検討した。

(2) 10 週齢 *ob/ob* マウス、*db/db* マウスにおける腸内細菌の解析

ob/ob マウス、*db/db* マウスはともに体重増加モデルではあるが、各々の腸内細菌叢の変化が腸管上皮内細胞に与える影響を検討する目的で、*ob/ob* マウス、*db/db* マウスから腸内細菌を分取し、16s-RNA-seq にて解析を行った。

(3) 腸管内における CD4 T 細胞の代謝を検討

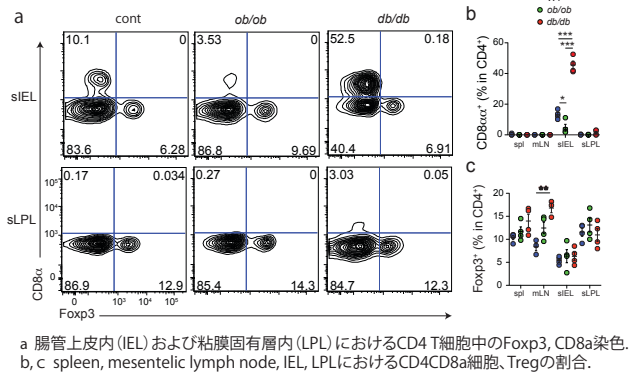
レプチンシグナルは細胞内代謝に影響を与えることが知られている。そこで細胞内代謝を計測する目的で sea horse を利用しレプチンシグナルの CD4 T 細胞代謝状態を計測した。

4. 研究成果

(1) レプチンシグナル欠損では CD4CD8aa 細胞割合は増加する。10 週のマウスにおける IEL は CD4CD8aa 細胞が CD4 陽性細胞中 10%程度であるのに対し、レプチン欠損 *ob/ob* マウスでは 3-5% と減少傾向であり、一方でレプチンシグナル欠損 *db/db* マウスでは 50%と有意に増加傾向であった。

一方で、LPL 中の Foxp3 陽性細胞は 12%程度でマウスによる差を認めなかった。

Figure 1



a 腸管上皮内 (IEL) および粘膜固有層内 (LPL) における CD4 T 細胞中の Foxp3, CD8a 染色. b, c spleen, mesenteric lymph node, IEL, LPL における CD4CD8a 細胞, Treg の割合.

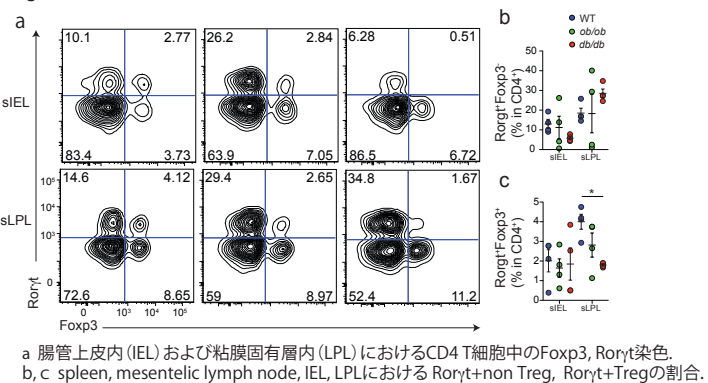
(2) 腸管内における Ror γ 陽性細胞の割合の検討

腸管内における Ror γ 陽性 Foxp3 陰性細胞の割合は IEL, LPL においてともに *ob/ob*, *db/db* マウスに差を認めなかった。また、Ror γ 陽性 Foxp3 陽性細胞集団の割合は、*db/db* マウスで減少傾向にあった。

Ror γ 陽性 Foxp3 陽性細胞

は腸内細菌依存性に誘導されることより、腸内細菌叢が変化している可能性が示された。

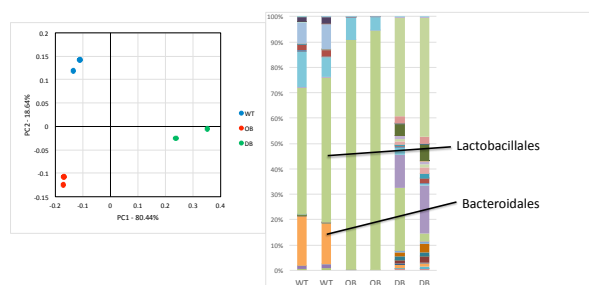
Figure 2



a 腸管上皮内 (IEL) および粘膜固有層内 (LPL) における CD4 T 細胞中の Foxp3, Ror γ 染色. b, c spleen, mesenteric lymph node, IEL, LPL における Ror γ +non Treg, Ror γ +Treg の割合.

(3) レプチンシグナル欠損マウスにおける腸内細菌叢の変化
db/db, *ob/ob* マウスより小腸便を回収し、腸内細菌叢を 16s-RNAseq にて解析した。これまで小腸便の解析はあまり行われてこなかったが、腸内細菌叢は *db/db*, *ob/ob* マウスでコントロール

Figure 3



WT, *ob/ob*, *db/db* マウス小腸便中の 16s-RNA seq
左 PCA analyse, 右 菌叢解析結果

と比較し大きく変化しており、とくに *Lactobacillus* が重要と考えられた。

(4) レプチンシグナルと代謝経路

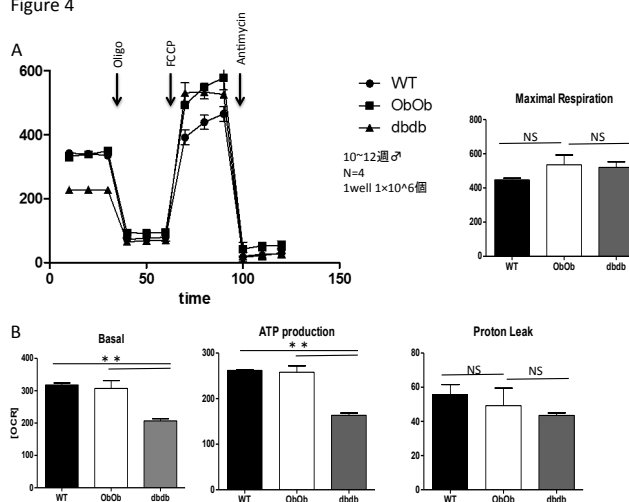
レプチンシグナルは細胞内代謝にとって必要な STAT3、AKT シグナルと共通点があるため細胞内代謝を計測する目的で sea horse システムを利用し細胞内代謝を計測した。

WT, *ob/ob*, *db/db* マウスより脾臓 naïve T 細胞を分取し、Oxygen consumption (OCR ; Oxphos の指標) , proton leak(ECAR ; 解糖系の指標)を計測した。WT, *ob/ob* と比較し、*db/db* においてはベースラインの Oxygen consumption rate が低く、ATP 産性能も低いことが明らかとなった。一方で

proton leak, maximal respiration には有意差がないことより、レプチンシグナルは、base line における OCR、ATP 産生のみに差が出ることが明らかであった。

さらに腸管上皮細胞では OCR が他の細胞より低いことを見出し、レプチンシグナル欠損が OCR を低下させることでより多くの腸管上皮細胞を誘導している可能性があると考えられた。

Figure 4



A, B WT, *ob/ob*, *db/db* マウスにおけるsplenic T細胞によるsea horse結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Kiyohara H, **Sujino T**(Corresponding Author), Teratani T, Miyamoto K, Arai MM, Nomura E, Harada Y, Aoki R, Koda Y, Mikami Y, Mizuno S, Naganuma M, Hisamatsu T, Kanai T. Toll-Like Rceptor 7 Agonist-Induced Dermatitis Causes Severe Dextran Sulfate Sodium Colitis by Altering the Gut Microbe and Immune Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. Sep 25; 7(1): 135-156. 査読あり
2. Tanemoto S, **Sujino T**, Kanai T. Intestinal immune response is regulated by gut microbe. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2017;40(6):408-415. 査読あり

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 筋野智久 腸管内における T 細胞の挙動 第 56 回小腸学会 2018 年
2. 筋野智久 腸管粘膜の構造解析 第 36 回大腸検査学会 2018 年
3. 筋野智久 皮膚炎と腸炎の関連性の検討 第 47 回日本免疫学会 2018 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。