

消化管における逆行性グルコース輸送機構の分子機構

および生理的意義の解明

神戸大学医学部附属病院 菅原健二

1 研究の背景と目的

メトホルミンは、60 年以上に亘って使用されてきた糖尿病治療薬であるが、その作用機構には不明な点が多く、メトホルミンの作用機構の全貌が明らかとなれば、糖代謝制御や糖尿病病態生理に関わる新しい概念の発見に繋がる知見となる。以前より、メトホルミン服用者では FDG-PET/CT 検査時に消化管における FDG の取り込みが増強することが知られていた。代表者は、最近登場した FDG-PET/MRI 画像を解析した結果、メトホルミン服用者では腸管壁組織よりも腸管内腔においてより強く FDG 集積が増強することが明らかとなった。

代表者らの見出した知見は、栄養素の吸収とは逆向きの輸送の存在を示すものであり、この新たな生理現象を、「消化管における逆行性グルコース輸送機構」と名付けた。生体イメージング FDG-PET/MRE 法により FDG の腸管内腔への集積速度からグルコース移動速度を算出すると、メトホルミン内服者のみならず非内服者においても逆行性グルコース輸送機構は体内における「大きな糖の流れ」として、生理的にも重要な役割を有していることが示唆された。

本研究では、消化管における逆行性グルコース輸送機構の分子メカニズムや生理的意義を包括的に解析することで、同機構の本態を明らかにするとともに、新たな糖尿病病態の解明や同機構を対象とした創薬応用への基盤を確立することを目的とする。

2 研究方法・研究内容

逆行性グルコース輸送機構は体内における「大きな糖の流れ」として、生理的にも重要な役割を有していることが示唆された。そこで本研究では、以下の 2 つのアプローチにより、同機構の本態を明らかにすることを目的とする。

(1)逆行性グルコース輸送機構の動態解析および糖輸送体の同定(大腸組織の RNA シークエンス解析)

6 週令 C57BL/6J マウスを 16 時間絶食の後、メトホルミンを 600 mg/kg の投与量で経口投与し、6 時間後にマウスを麻酔の後安楽死の後盲腸断端から 1cm 大腸組織を摘出した。次に、腸管サンプルから RNA を抽出および定量化した後、RNA シークエンス解析をマクロジェンへの委託により行った。各 RNA サンプルから TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina) により mRNA のペアエンドライブラリを作成し、Illumina NovaSeq 6000 システムを用いてシークエンス分析した。各サンプルあたりのリード数は 4×10^7

であり、ヒトの参照配列として GRCh38 を使用した。得られたデータから、グルコース輸送に関わるトランスポーターを抽出し、メトホルミン投与の有り無しによる発現量の比較検討を行った。比較は Student's t-test にて行い、 $P < 0.05$ を統計的有意とした。

(2) 逆行性グルコース輸送機構の生理的意義の解明(腸内細菌叢解析)

逆行性グルコース輸送機構により血中のグルコースが腸管内に供給された場合、腸内細菌の組成やその代謝物の変容作用を介して、宿主の血糖降下作用や体重減少作用などに影響を与える可能性がある。そこで、マウス実験系により、メトホルミンによる逆行性グルコース輸送機構の活性化が腸内細菌叢に与える影響を解析する。

6週令 C57BL/6J マウスに対して、メトホルミンを飲水に 3 mg/mL の濃度で溶解し、自由飲水にて4週間経口投与した。その後、糞便サンプルを回収し、DNA を抽出・定量の後、レリクサ株式会社への依頼により 16S rRNA 遺伝子解析を行った。シーケンスライブラリーは NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina により調製し、Illumina NovaSeq 6000 によりシーケンス分析し、各サンプルあたり平均 50,000 リードの 250 bp ペアエンドリードを生成した。各サンプル内の微生物群集の構成は、taxonomic bar graph を用いて視覚化した。各サンプル内の微生物多様性を評価するために、Shannon index によりアルファ多様性指数を計算した。

3 研究成果

本研究では、はじめにメトホルミンによる腸管腔内へのグルコース排泄メカニズムを明らかにする第一段階として、グルコース排泄に関与する分子の同定を試みた。また、逆行性グルコース輸送機構により血中のグルコースが腸管内に供給された場合、腸内細菌の組成やその代謝物の変容作用を介して、宿主の血糖降下作用や体重減少作用などに影響を与える可能性がある。したがって、メトホルミンにより腸内細菌叢に与える影響を解析した。

(1) 逆行性グルコース輸送機構の動態解析および糖輸送体の同定

腸管腔内へのグルコース排泄機構の分子メカニズムを明らかにする第一段階として、マウス実験系で特に FDG の集積が強かった大腸組織における排泄に関与するグルコース輸送体の同定を試みた。正常マウスに 600 mg/kg のメトホルミンを経口投与し、6時間後の大腸組織を用いて、RNA シーケンス解析を行った。その結果、階層的クラスタリング解析では、メトホルミン投与により大腸での遺伝子発現量には大きな差が生じることが明らかになった (図 1A)。

次に、RNA シークエンス解析データから、グルコース輸送体を抽出し、各々の遺伝子の TPM(transcripts per million)を比較検討した。グルコース輸送体として Glut1、Glut2、Glut3、Glut4、Sglt1 のデータの取得に成功したが、Glut2 および Glut3 は TPM の値は低く、発現量が極めて少ないことが

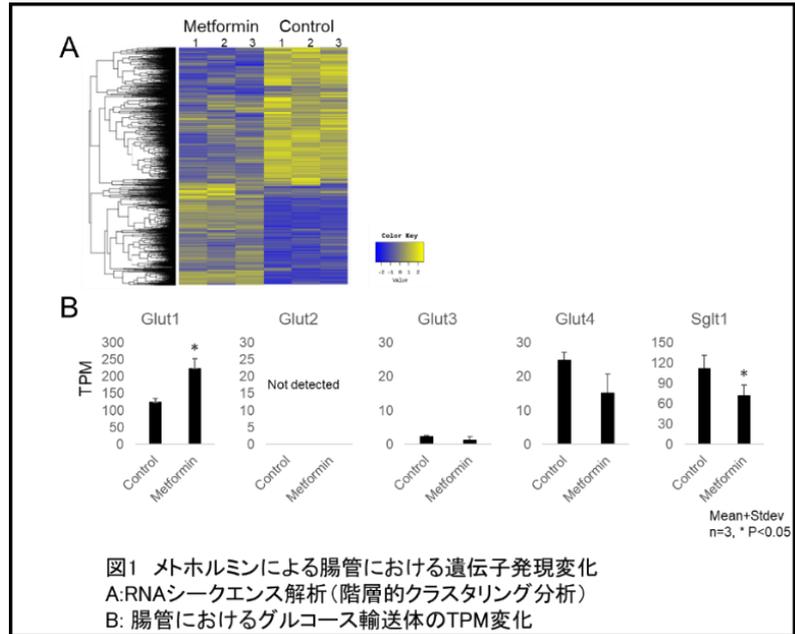


図1 メトホルミンによる腸管における遺伝子発現変化
A:RNAシーケンス解析(階層的クラスタリング分析)
B: 腸管におけるグルコース輸送体のTPM変化

示唆された。Glut1 はメトホルミン投与により有意に TPM が増加した(コントロール群 125.3 ± 10.2 、メトホルミン群 224.9 ± 28.1 、 $p < 0.05$)一方で、Sglt1 ではメトホルミンに有意に TPM の低下(コントロール群 112.8 ± 18.3 、メトホルミン群 72.7 ± 15.3 、 $p < 0.05$)が認められ、Glut4 は有意差を認めなかったものの低下傾向(コントロール群 25.0 ± 2.3 、メトホルミン群 15.3 ± 5.6 、 $p = 0.08$)を認めた (図 1B)。

以上の結果により、メトホルミンによる腸管腔内へのグルコース排泄機構においては GLUT1 の発現量の増加および SGLT1 の発現量の低下が関与することが示唆された。

(2) 逆行性グルコース輸送機構の生理的意義の解明

次に、逆行性グルコース輸送経路の生理的意義の解明を目的として、正常マウスにメトホルミンを投与し、糞便を対象とした網羅的な腸内細菌叢の組成分析を行うことで、逆行性グルコース輸送機構の亢進による腸内細菌叢の多様性や属レベルでの構成の変化を解析した。

その結果、メトホルミン投与により属レベルにおいて *Lctobacillus* の割合が有意に増加し(コ

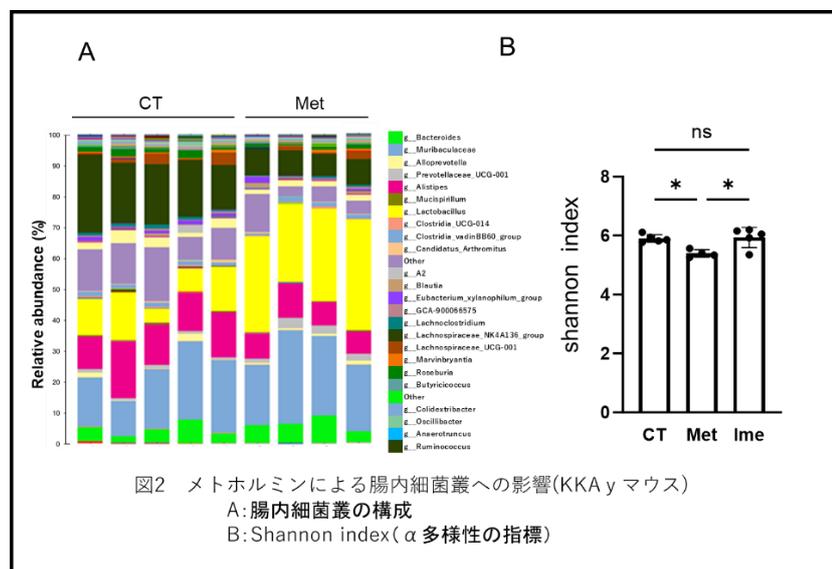


図2 メトホルミンによる腸内細菌叢への影響(KKA y マウス)
A: 腸内細菌叢の構成
B: Shannon index(α 多様性の指標)

ントロール群 $10.70 \pm 4.554\%$ 、メトホルミン群 $30.60 \pm 4.355\%$ 、 $p < 0.01$)、一方で、*Lachnospiraceae*(NK4A-group)の有意な減少(コントロール群 $19.3 \pm 4.0\%$ 、メトホルミン群 $7.9 \pm 0.6\%$ 、 $p < 0.01$)が認められた(図 2A)。

腸内細菌叢を検討した実験からは、メトホルミンの投与により、*Lactobacillus* の有意な増加が誘導されることが明らかとなった。さらに、本検討では *Lachnospiraceae* の有意な減少も明らかになった(図 2B)。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究で着目した逆行性グルコース輸送機構のメカニズムや生理的意義は、糖尿病の新たな病態解明に関与する可能性があることから、同機構の理解を深めることで、糖尿病の新たな治療薬の開発を介した糖尿病治療の進展に貢献すると考えられる。

また、以前から、消化管による生体の代謝調節機構は知られていたが、インクレチンによる膵β細胞からのインスリン分泌調節やグレリンによる食欲調節など、消化管ホルモンや神経系を介した遠隔作用として認識されていた。近年、メトホルミンは腸内細菌およびその代謝物の変容を介して宿主の耐糖能改善に寄与することが明らかとなり(Nature 2015;528:262; Nat Med 2017, 23:850; Nat Med 2018, 24:1919)、腸内細菌を介した耐糖能改善メカニズムの解明が待たれている。本研究により逆行性グルコース輸送機構の生理的意義として、腸内細菌叢や代謝物の変容に寄与することが明らかになれば、糖尿病研究のみならず腸管を介した新たな糖代謝調節機構が明らかになる可能性があり、学術的意義も極めて高い。