

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00811

研究課題名(和文) II型糖尿病の発症を抑制するビタミンEの新規生理作用

研究課題名(英文) Novel physiological function of vitamin E to prevent the onset of type II diabetes

研究代表者

藤原 葉子 (Fujiwara, Yoko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：50293105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥満により高血糖に長期間晒されると、膵臓が疲弊してインスリンが分泌できないII型糖尿病を発症する。日本人は遺伝的にインスリン分泌能が低いためII型糖尿病になりやすく、発症前の予防が重要である。申請者らはこれまでに、ビタミンEの同属体であるトコトリエノール(T3)は、高脂肪食で飼育したマウスのインスリン分泌能を維持し、耐糖能異常を改善することを見出しており、本研究では動物実験と細胞培養の両方からその作用メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Type II diabetes is characterized by a progressive decline in beta-cell function and chronic insulin resistance. It is caused by the rupture of pancreatic function after long time exposure to hyperglycemia by obesity. As Japanese people genetically have low insulin secretion ability, they tend to be a type II diabetes, prevention before disease onset is important. This study aimed to show the evidence that tocotrienol (T3), a homolog of vitamin E, would be effective to prevent the onset of Type II diabetes by retention the insulin secretion ability of mice fed with a high fat diet. We clarified a part of beta cell function maintenance and its mechanism of action by vitamin E from both animal experiment and cell culture.

研究分野：栄養化学 脂質栄養学

キーワード：ビタミンE インスリン抵抗性 細胞 耐糖能 肥満

1. 研究開始当初の背景

(1) 食生活や生活習慣の悪化による肥満とそれに起因するメタボリックシンドロームは社会問題となっている。肥満による耐糖能悪化から高血糖状態に晒されると、膵臓は血糖を低下するためインスリンを多量に分泌するようになる。この状態が長期間続くことで膵臓が疲弊し、インスリンを分泌できなくなると II 型糖尿病が発症すると考えられているが、日本人は遺伝的にインスリン分泌能が低いため、欧米人よりも II 型糖尿病を発症しやすい。

(2) ビタミン E は強い抗酸化作用を持つ脂溶性ビタミンで、生体内酸化ストレスからの防御作用を持つ。ビタミン E は、クロマン環のメチル基の数と位置の違いから α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種類と側鎖の種類によりトコフェロールとトコトリエノールに分けられ、計 8 種類の同族体が存在する。ビタミン E として生体内で最も強い作用をもつのは α トコフェロール (α Toc) であるが、近年、トコトリエノール (T3) には、抗腫瘍作用やコレステロール低下作用など、トコフェロールにはない抗酸化以外の生理作用があることが報告され、注目を集めている。我々はこれまでに、ビタミン E の 8 つの同族体のうち、植物油に多く含まれる γ トコトリエノール (γ T3) を高脂肪食に添加して飼育したマウスでは、 α Toc と比較して耐糖能異常を改善すること、さらにその時の血中のインスリン分泌能は維持されていることを見出した。

2. 研究の目的

(1) 日本人の糖尿病患者は年々増加し、予備群を含めると約 1000 万人と推定されている。糖尿病は一度発症すると重症化する多臓器疾患で完治が難しいため、膵臓の代替機能が破綻する前に防ぐことが重要である。膵臓のインスリン分泌を促進する治療法としては、インクレチンやその受容体に直接作用する GLP-1 受容体作動薬 (リラグルチド) に注目が集まっているが、ビタミン E が糖尿病になりやすい日本人の糖尿病発症を遅らせることができれば、食生活を改善することで、発症を未然に防ぐことにつながる。本研究では、肥満による耐糖能異常において T3 の効果を明らかにし、その科学的根拠を示すことを目的とした。

(2) T3 の作用メカニズムとして、「T3 は肥満誘導性高血糖状態において、インスリン分泌をになう膵 β 細胞の機能を維持することで、糖尿病発症を予防する」という仮説をたて、高脂肪食誘導性肥満モデル動物を用いた *in vivo* および、培養細胞系を用いた *in vitro* の両面から検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食誘導性肥満マウスのビタミン E

の影響

6 週齢の C57BL/6J 雄マウス 18 匹を 1 週間の予備飼育の後 3 群に週間分け、AIN93G を基準とした高脂肪食 (脂肪エネルギー比 46%) でビタミン E を含まない HF コントロール食、これに 0.1% (W/W) の α トコフェロール (α Toc) を含む α Toc 食、および HFD に 0.1% (W/W) の γ -トコトリエノール (γ T3) を添加した γ T3 食をそれぞれ与えて 22 週間飼育した。

実験食開始から 8 週目および 16 週目に経口糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test; OGTT) およびインスリン負荷試験 (Insulin Tolerance Test; ITT) を行った。実験終了時の 22 週目には 12 時間の絶食後マウスの血液、膵臓、脂肪組織などを採取し、血糖値と血中インスリン濃度を測定した。

膵臓から総 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法で膵臓 β 細胞の分化や増殖に関わる遺伝子 (図 1) の発現量を測定した。

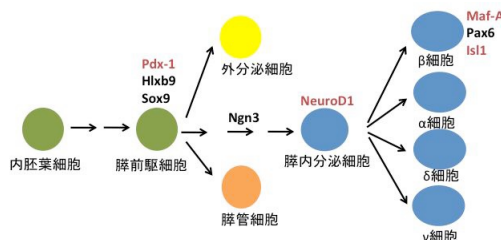


図 1 膵細胞の分化に関わる遺伝子

ビタミン E 投与による膵臓 β 細胞への影響を詳細に検討するため、解剖 2 時間前に 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与し、膵臓への BrdU の取り込みを免疫組織化学的に解析した。さらに、増殖マーカーである Ki67 とインスリンの二重染色を行い、インスリン分泌細胞である膵 β 細胞の増殖について解析した。

膵臓からのインスリン分泌増殖因子として発見された β トロフィンの脂肪組織での発現量を定量 RT-PCR 法、および Western Blotting 法で調べた。

(2) 培養細胞系を用いたビタミン E の膵 β 細胞増殖や機能維持に及ぼす影響

ヒト膵臓 β 細胞モデルとして 1.1B4 を用いた。1.1B4 細胞を播種し、2 時間培養した後、 α Toc (終濃度 20 μ M、100 μ M)、 γ T3 (終濃度 10 μ M、20 μ M) を含む培地に培地交して細胞増殖能を、細胞数測定および BrdU 取り込み量にて評価した。

細胞増殖に関わる細胞内シグナル経路を検討するため、mTORC1 阻害剤である Rapamycin の投与により mTORC1、PI3K 阻害剤の LY294002、および MEK1/2 経路の阻害剤として PD0325901 を用いて検討した。

ラット由来 Rin5F 細胞を用い、メタボリックシンドロームを想定した脂肪毒性モデルにおけるビタミン E の影響を検討した。Rin5F

細胞を培養し、終濃度 100 μ M のパルミチン酸を添加し、 α Toc (50 μ M) および γ T3 (50 μ M) を添加して、培養液中に分泌されたインスリン量をインスリン ELISA キットで測定した。

脂肪細胞と膵 β 細胞との相互作用を検討した。マウス由来 3T3-L1 細胞に α Toc および γ T3 を添加し 24 時間培養した後、細胞を回収して総 RNA を抽出した。 β 細胞のインスリン分泌能を促進することが報告されていた β トロフィンの mRNA 量を定量 RT-PCR 法で測定した。また、この培養液を濃縮して、マウス β 細胞由来 Min6 細胞に添加し、Min6 細胞の増殖能について、BrdU 取り込みアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食摂取時の γ T3 は耐糖能異常を改善する。

高脂肪食を摂取させたマウスは、試験食摂取後 10 週目までに体重は 2 倍以上と肥満を呈するようになった。8 週目と 16 週目に OGTT と ITT を行った。通常食と比較して HFD 群では耐糖能が悪化したが、 γ T3 群では他の高脂肪食群と比較して耐糖能の悪化が軽減される傾向が見られた。この差は 8 週よりも 16 週のほうで大きくなった。インスリン抵抗性については 3 群間で差は認められなかった。

空腹時と糖負荷 15 分後の血中インスリン濃度を測定したところ、高脂肪食群の 8 週目では糖負荷後の 2.5 倍程度に増加したが、 γ T3 添加群では 3 倍程度に増加した。16 週目では、8 週目よりも空腹時インスリンレベルが 3 倍以上高値になっており、糖負荷後のインスリン上昇は肥満度が進むにつれ、空腹時インスリンレベルが高く、糖負荷後の血中インスリン上昇率は 30%程度であったが、 γ T3 投与群では空腹時インスリンレベルがコントロールの 8 割ほどと低く、糖負荷後には 2 倍になっていた。すなわち、 γ T3 摂取マウスでは高インスリン血症が軽減し、インスリン感受性が良好であることがわかる。これらの結果から、 γ T3 は高脂肪食誘導性肥満状態の耐糖能異常を、インスリン分泌能を維持することで改善する可能性が示された。複数回実験を重ねた結果、20 週以上飼育した場合には、 γ T3 の影響も認められなくなることも分かった。これらのことから、 γ T3 摂取でも最終的にはインスリン分泌が破綻するが、糖尿病発症までの未病状態を延長する可能性があるものと考えられた。

(2) γ T3 は膵 β 細胞の増殖を促進する。

肥満に起因する耐糖能異常状態では、膵臓は血糖値を下げるために代替作用として膵島は肥大する。我々はこの時のマウスの膵島の数と大きさを検討したところ、 γ T3 添加食群では、特に小型の膵島数が顕著に増加していることを見出した。そこで、膵 β 細胞の増殖が、前駆細胞から β 細胞への分化によるもの

なのか、それとも β 細胞自身の自己複製によるものなのかを調べるため、膵臓の総 RNA から β 細胞分化マーカー遺伝子、および増殖に関連するタンパク質発現を検討した。

β 細胞の分化に関連する PDX-1、MafA、NeuroD1、NKx6.1、Islet1 などどれも γ T3 の添加による差が認められなかった。一方、免疫組織化学的手法による解析を行ったところ、増殖に関わる Ki67 や BrdU の蛍光免疫染色は γ T3 投与群で増加していた。 β 細胞の自己複製は、胎児期や胆管結索時に起こり、成長した個体ではほとんど見られないと考えられている。本研究においてもインスリンとの二重染色した Ki67 陽性細胞は、通常食で 0.02%ほどだったが、高脂肪食では 0.1%程度であった。しかしながら、 γ T3 添加群では 1.3%程度と、増殖している β 細胞の数が顕著に多かった (図 2)。これらの結果から、耐糖能異常時に γ T3 は、 β 細胞の分化促進というよりは、 β 細胞の自己複製を促進することで、 β 細胞の数を増やし、インスリン分泌能を維持している可能性が示唆された。

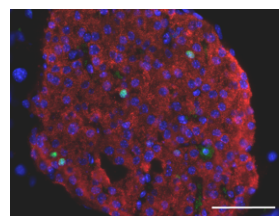


図 2. γ T3 投与マウス膵臓の免疫組織染色

(3) β 細胞の増殖に対する γ T3 の直接的な作用の検討

β 細胞の増殖は、 γ T3 の直接的な作用なのかを調べるため、ヒト β 細胞モデルである 1.1 B4 細胞に α Toc および γ T3 を添加して BrdU アッセイによる細胞増殖能を調べた。 α Toc よりも γ T3 のほうが低濃度で細胞増殖を促進した。特に細胞播種後の細胞数が少ないときに有意に増加促進作用を持つことが分かった。さらに阻害剤を用いた検討から、 γ T3 は MEK 経路を介して細胞増殖を促進する可能性が示唆された。

(4) γ T3 の β 細胞増殖と臓器間ネットワークの関係

ビタミン E としての生体効率が最も高いのは、 α Toc であり、 γ T3 は様々な機能が知られているものの、比較的速やかに代謝され、肝臓や血中から消失し、組織中では皮膚や脂肪組織に蓄積することが知られている。本研究による作用は α Toc よりも γ T3 に顕著であるため、 γ T3 が蓄積して作用する可能性の高い脂肪組織との関連を検討した。

2013 年に Melton らは、膵 β 細胞の増殖を促進する脂肪細胞から分泌されるホルモンを同定し、 β トロフィンと名付けた。そこで、 γ T3 によって脂肪細胞における β トロフィンの発現が増加するのかどうかを、マウスの

脂肪細胞と培養脂肪細胞である 3T3-L1 の両方で調べた。その結果、マウスの脂肪組織では γ T3 摂取群のみで、脂肪細胞では、 γ T3 の添加濃度依存的に β トロフィンの mRNA 発現量 (図 3)、およびタンパク質レベルでの増加が認められた。しかし、 β トロフィンの β 細胞増殖促進作用については異論が唱えられ、ついに 2016 年には著者らから論文の取り下げがなされたため、本研究における γ T3 投与と β トロフィンの増加やその意義についても現時点では不明である。

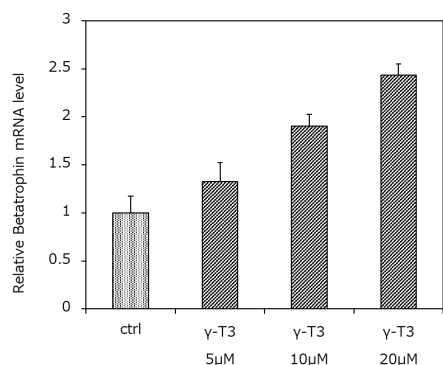


図 3. 3T3-L1 細胞における γ T3 添加の β トロフィン発現量に及ぼす影響

3T3-L1 細胞の培養液を濃縮し、1.1B4 細胞に添加したときには、増殖の促進作用も認められたことから、脂肪細胞から分泌される何等かの因子が β 細胞に働いている可能性はあるが、 γ T3 による促進効果は認められなかった。

さらに、ラットインスリノーマ細胞である Rin5F 細胞にパルミチン酸を添加すると、細胞外へのインスリン分泌が抑制されるが、 α Toc 及び γ T3 を添加しておくこと、インスリン分泌量が低下しないことも分かった。これは γ T3 に特異的な作用ではなく、 α Toc にも認められたことから、インスリン抵抗性状態の β 細胞の機能維持については、細胞増殖促進作用とは別の機序が関わっていることが推測される。

以上本研究の結果より、肥満に起因する耐糖能異常に対してビタミン E 同族体の γ T3 は、直接あるいは間接的に膵臓に作用し、 β 細胞の分化誘導というよりは、 β 細胞の自己複製によって、小型の膵島を多く作り、インスリン分泌能を維持することで、糖尿病発症に至る膵島のインスリン分泌破綻までの未病期間を延長する可能性が示唆された。日本人は欧米人よりも遺伝的にインスリン分泌能が低く糖尿病を発症しやすい。栄養素であるビタミン E の摂取が予防に有効であるというエビデンスが得られれば、日本人の食生活指導に有益である、さらに研究を続けていきたい。

<引用文献>

- ① ビタミン E 同族体が高脂肪食誘導性肥満マウスの耐糖能に及ぼす影響 近松出穂、

吉原千寿、山下香織、赤尾茉依、園田麻里子、石川朋子、池本真二、西川可穂子、曾根保子、市 育代、藤原葉子 ビタミン(2012) 86(12) 671-677

- ② Betatrophin: Hormone that controls pancreatic β cell proliferation. Peng Yi, Ji-sun Park, and Douglas A. Melton. A (2013) Cell 153, 747-758

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① トコトリエノールの膵 β 細胞に及ぼす影響 藤原葉子、川村悠貴、富野志穂、佐藤春香、園田麻里子、市育代、石川朋子、曾根保子 日本ビタミン学会第 67 回大会 2017 年 6 月 7 日 横浜開港記念会館
- ② トコトリエノールが高脂肪食誘導性肥満モデルマウスの膵臓の細胞増殖に及ぼす影響 柴田彩霞、池上寛子、佐藤春香、川和理恵、市育代、石川朋子、藤原葉子 第 27 回ビタミン E 研究会 2016 年 1 月 高松あなぶきホール
- ③ The effects of Vitamin E Homologues on Insulin Secretion from Pancreatic Beta Cell. Haruka Sato, Izuho Chikamatsu, Ikuyo Ichi, Yasuko Sone, Yoko Fujiwara. 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 札幌コンベンションセンター
- ④ Tocotrienol improves the glucose tolerance in obese mice induced by high fat feeding. Haruka Sato, Yuki Kawamura, Shiho Tomino, Mariko Sonoda, Ikuyo ichi, Yasuko Sone, Tomoko Ishikawa, Yoko Fujiwara. 12th Asian Congress of Nutrition 2015 年 5 月 パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www-p.hles.ocha.ac.jp/food-eiyo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 葉子 (FUJIWARA, Yoko)

お茶の水女子大学・基幹研究院自然科学系・教授

研究者番号：50293105

(2) 研究分担者

石川 朋子 (ISHIKAWA, Tomoko)

お茶の水女子大学・プロジェクト研究院・特任准教授

研究者番号：70212850