

令和元年6月18日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08550

研究課題名(和文) グルカゴンシグナルを指標とした食餌性亜硝酸塩による抗糖尿病効果の解明

研究課題名(英文) Effect of glucagon on antidiabetic effect induced by nitrite

研究代表者

土屋 浩一郎 (TSUCHIYA, Koichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：70301314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TC細胞を用いてグルカゴン分泌に対する亜硝酸塩の影響を検討した。亜硝酸塩をTC細胞に添加した場合、グルカゴン分泌の濃度依存的な減少が確認された。さらに、亜硝酸塩の添加によりAMPKのリン酸化が観察され、これはAMPK阻害剤であるcompound Cの存在下では、グルカゴン分泌の抑制が解除された。また、糖新生に關する肝臓細胞を用いて亜硝酸塩の影響を調べたところ、亜硝酸塩は糖新生を抑制する事が明らかになった。以上の結果より、亜硝酸塩は空腹時血糖を改善する可能性を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は硝酸塩を食物から摂取しており、その一部は口腔内細菌によって亜硝酸イオンに還元され、さらにNOへと変換されている。実験動物に亜硝酸イオンを経口投与すると空腹時血糖値の有意な低下が観察されたことからグルカゴン分泌に対する亜硝酸イオンの影響を検討したところ、亜硝酸イオンはAMPK活性化を介してグルカゴン分泌および肝細胞からの糖新生に影響を与えていることが示唆され、亜硝酸イオンの新たな生理作用を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of nitrite on glucagon secretion using TC cells. When nitrite was added to TC cells, a concentration-dependent decrease in glucagon secretion was observed. Furthermore, nitrite-derived suppression of glucagon and phosphorylation of AMPK were ameliorated in the presence of the AMPK inhibitors compound C. Moreover, gluconeogenesis from liver cells was suppressed by nitrite through AMPK activation, suggesting that nitrite has the potential to improve fasting blood glucose.

研究分野：医療薬学

キーワード：亜硝酸イオン 硝酸イオン グルカゴン 一酸化窒素

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の血液中には一定量の硝酸イオンと亜硝酸イオンが存在し、その大部分は尿中に排泄されるため、最近まで、血中の無機の硝酸イオンや亜硝酸イオンは生体内で一酸化窒素 (NO) が代謝された際に生じる不活性な最終代謝物および中間代謝物と考えられ、食品中の硝酸・亜硝酸塩は不純物と考えられてきた。

しかし我々は、静脈内投与や飲水に混ぜて経口で投与した亜硝酸塩は体内で NO へと還元されることを、亜硝酸の安定同位体を用いて証明し、さらに他の研究者らによって硝酸塩も口腔内嫌気性細菌によって亜硝酸に還元を受け、同様に NO へと変化することが報告された。

また我々は、腎臓が虚血に至ったときには腎臓中の亜硝酸塩が NOS に代わり NO を生成することで臓器保護作用を有することを見出してきた。

これらの知見から、最近では血中及び組織中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオンは、生体に負荷がかけられたときの、NOS に代わる NO 生成のためのプールだと認識されるに至っている。ところで、セリン/スレオニンキナーゼに属する AMPK は細胞内 AMP/ATP 比が上昇すると活性化され、その下流のエフェクターのリン酸化を誘導し、グルコースの細胞への取り込みを上昇させることから、2 型糖尿病に見られるインスリン抵抗性に対する標的としても注目されている。さらに、AMPK の活性化は血管内皮細胞の eNOS を活性化することで内皮血管保護作用やそれに伴う臓器保護作用の主要なプレイヤーの一つと考えられるようになった。ヒト腎糸球体内皮細胞 (HREC) を用い亜硝酸塩投与時の AMPK 活性化について検討したところ、亜硝酸塩によって AMPK の活性化が観察され、またその下流の ACC のリン酸化、および eNOS のリン酸化が観察された。さらに亜硝酸による AMPK 活性化の分子機構として、LKB1 を介する経路を見出してきた。

これらの研究の中で、高脂肪食を摂取させた動物に亜硝酸塩を投与すると、OGTT 改善ならびに空腹時血糖値低下作用、血中中性脂肪値低下作用を観察した。特に空腹時血糖低下作用は顕著であったが、インスリン分泌やインスリン感受性には変化がないため、亜硝酸塩がインスリン以外の血糖調節因子に働いている可能性が示唆された。

我々は一連の研究によって亜硝酸塩が AMPK を活性化すること、また、AMPK の活性化には LKB1 が介することを明らかにしてきたが、最近の報告で LKB1 による AMPK の調節は、膵  $\alpha$  細胞のグルカゴン分泌を調節することが報告されている。近年、糖尿病の発症と進展に『グルカゴン仮説』として、グルカゴンの過剰分泌が中心的役割を果たしている事に注目が集まっていることから、亜硝酸塩の血糖降下作用のメカニズムとして、膵  $\alpha$  細胞に対する亜硝酸塩のグルカゴン分泌調節作用が示唆されるが、そのような報告は無い。

### 2. 研究の目的

本研究では、亜硝酸塩によるグルカゴン分泌調節作用を介した抗糖尿病作用の解明を目的として実験を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 亜硝酸塩が $\alpha$ -TC 細胞からのグルカゴン分泌に与える影響の検討

24well プレートにグルカゴン分泌腫瘍細胞であるマウス由来  $\alpha$  TC 細胞を D-MEM Low Glucose 培地 (10% FBS) に播種 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) し、3 日間インキュベートしたのち、細胞を PBS で洗浄し KRB buffer + 16.7 mM Glucose buffer で 1 時間プレインキュベートし、KRB buffer + 5 mM Glucose buffer (低グルコース buffer) で種々の濃度の亜硝酸塩と 2 時間培養し培養上清を採取してグルカゴン濃度を測定した。グルカゴンの定量は Glucagon 500 test (Cisbio assay) を用い、タンパク量で補正した。

#### (2) AMPK 活性化剤がグルカゴン分泌に与える影響の検討

(1) と同様の実験条件で、亜硝酸塩の代わりに AMPK 活性化剤である AICAR (1 mM) および metformin (1 mM) を添加し、添加 2 時間で細胞上清に分泌されるグルカゴンを定量した。

#### (3) $\alpha$ -TC 細胞において亜硝酸塩が AMPK の活性に与える影響の検討

$\alpha$ -TC 細胞を D-MEM Low Glucose 培地 (10% FBS) に播種 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) し 3 日間インキュベートしたのち、細胞を PBS で洗浄し、亜硝酸塩による刺激の 20 分前に 0.1% BSA/KRHepes buffer に交換したのち亜硝酸塩で刺激し、細胞溶解液を用いて AMPK およびリン酸化 AMPK を WB で検討した。

#### (4) 亜硝酸塩の刺激によるグルカゴン分泌の減少及び AMPK の活性化に対する Compound C の影響

(1) における亜硝酸塩刺激によるグルカゴン分泌抑制に (3) における亜硝酸塩による AMPK 活性化が関与しているか否かを検討するため、AMPK 阻害剤である Compound C 共存下で、10  $\mu$ M 亜硝酸塩によるグルカゴン分泌と AMPK リン酸化をそれぞれ検討した。

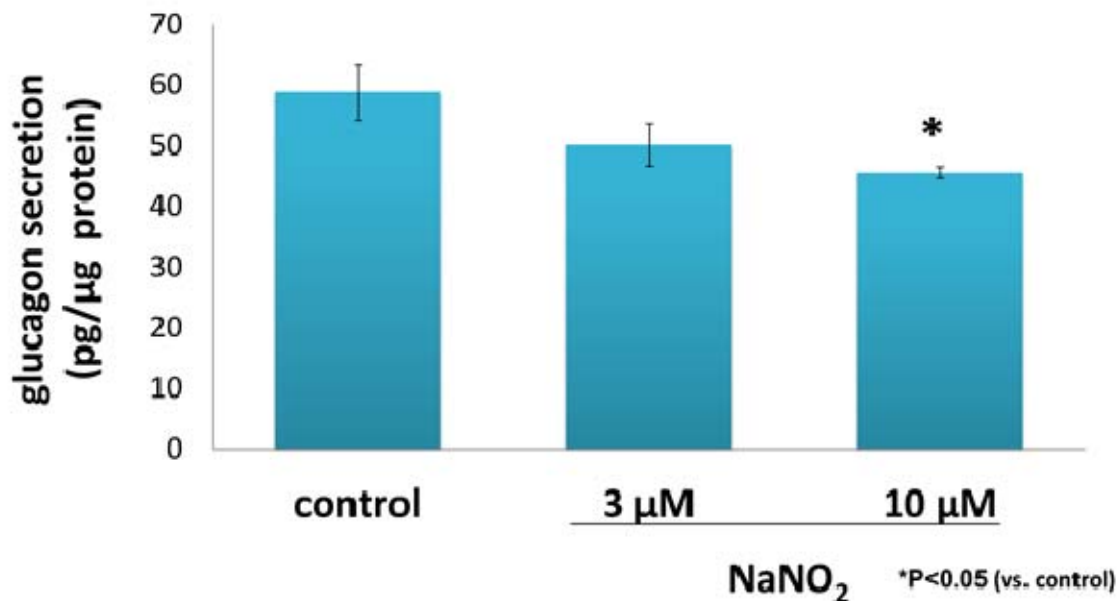
#### (5) 亜硝酸塩が肝細胞からの糖新生に与える影響の検討

ラット肝実質細胞由来の Fao 細胞を Ham's F-12 培地 (10% FBS) で播種し ( $3 \times 10^5$  cells/mL)、3 日間インキュベートした。刺激剤を調整したグルコース不含培地で 2 時間培養し、培養上清を回収してグルコース濃度を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 亜硝酸塩が $\alpha$ -TC 細胞からのグルカゴン分泌に与える影響の検討

$\alpha$ -TC 細胞からのグルカゴンの分泌は、亜硝酸塩の濃度依存的に減少することが見出された。

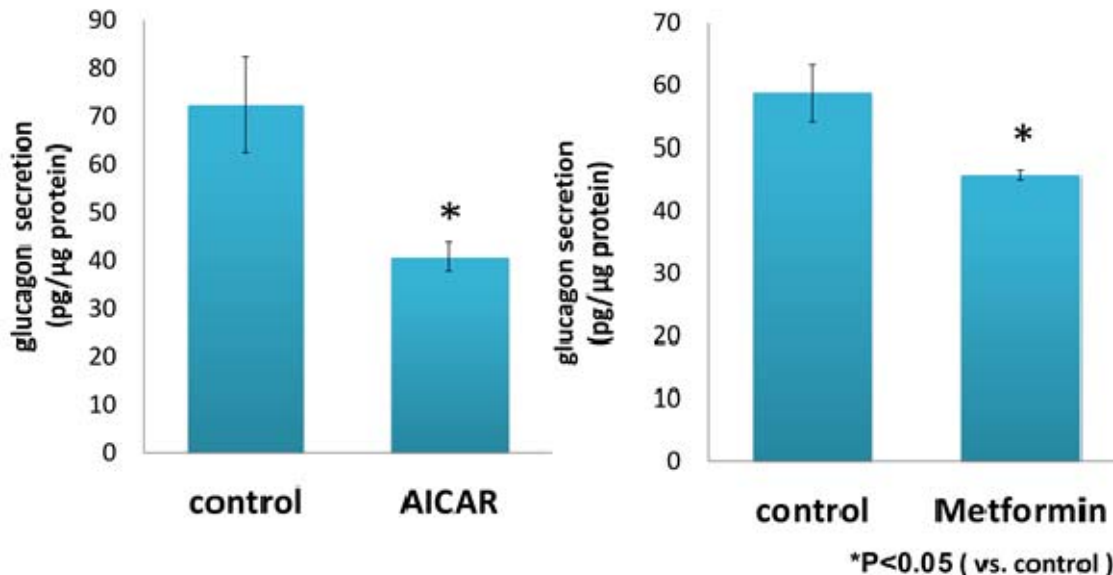


亜硝酸塩によりグルカゴン分泌が減少したメカニズムを解明するにあたって AMPK という酵素に注目した。AMPK は、活性化することにより解糖系や脂肪酸酸化、糖取り込みといった異化経路を促進し、糖新生、グリコーゲン合成、脂質合成といった同化経路を抑制することが知られている。

グルカゴン分泌の制御にこの AMPK が関与している可能性を検討するため、AMPK 活性化剤である AICAR、メトホルミンを用いて、グルカゴン分泌量を測定した。

(2) AMPK 活性化剤がグルカゴン分泌に与える影響の検討

AMPK 活性化剤である AICAR とメトホルミンを用いて  $\alpha$  TC 細胞を刺激し細胞からのグルカゴン分泌量を測定したところ、AICAR、メトホルミンともにグルカゴン分泌が減少することが見出された。



この結果より、AMPK の活性化がグルカゴン分泌の減少に関与していることが示唆された。

(3)  $\alpha$ -TC 細胞において亜硝酸塩が AMPK の活性に与える影響の検討

亜硝酸塩を 0-100  $\mu$ M と変化させ、また刺激時間を 10, 30, 60 分とした時のリン酸化 AMPK を検討したところ、刺激時間にかかわらず、10  $\mu$ M の亜硝酸塩の時に最も高いリン酸化 AMPK が観測された。そこで、以降の実験では亜硝酸塩による刺激は 10  $\mu$ M で実施した。

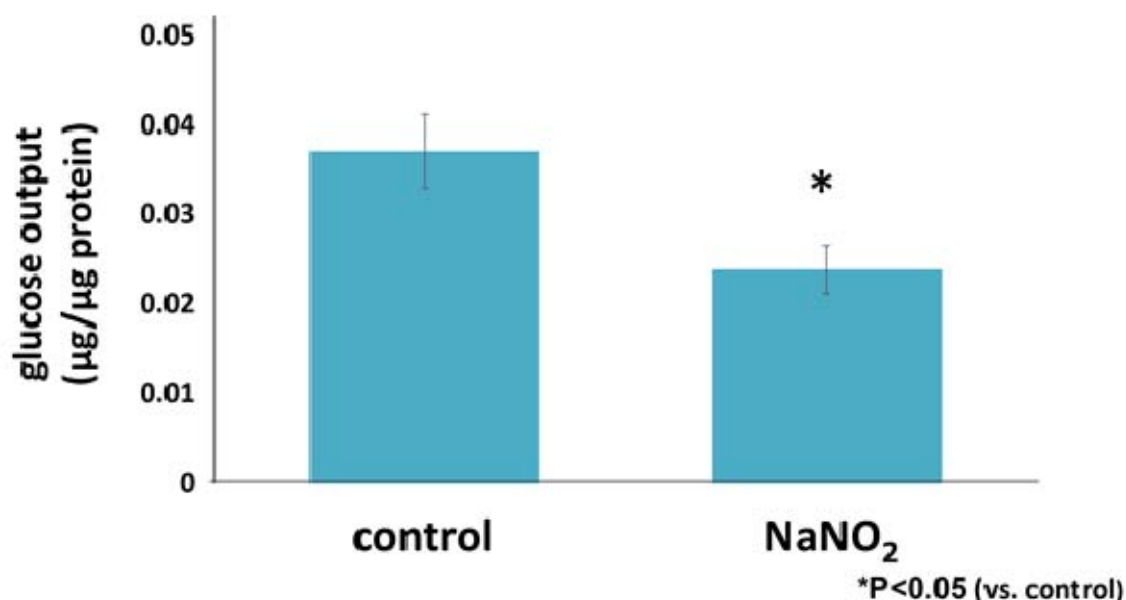
(4) 亜硝酸塩の刺激による  $\alpha$  TC 細胞からのグルカゴン分泌の減少及び AMPK の活性化に対する Compound C の影響

Compound C は  $\alpha$  TC 細胞からのグルカゴン分泌には影響を与えないことを確認した。この条件において、10  $\mu$ M 亜硝酸塩による  $\alpha$  TC 細胞からのグルカゴン分泌の抑制は Compound C が共存することで有意に改善することを見出した。

さらに、10  $\mu$ M 亜硝酸塩によるリン酸化 AMPK の上昇は、Compound C により低下した。

(5) 亜硝酸塩が肝細胞からの糖新生に与える影響の検討

10  $\mu$ M 亜硝酸塩の刺激で Fao 細胞からのグルコース分泌は有意に低下した。



これは AMPK 活性化剤である AICAR でも同様であった。さらに、亜硝酸塩の刺激により減少したグルコース分泌が Compound C により回復することを見出した。

本研究で得られた結果から、 $\alpha$ TC 細胞において亜硝酸塩が AMPK の活性化を介してグルカゴン分泌を抑制することが明らかになった。また、肝臓において亜硝酸塩が AMPK の活性化を介して糖新生を抑制すること明らかになった。以上のことから、亜硝酸塩はこれら 2 つの機序を介して、空腹時血糖値を改善させる可能性が見出された。また、亜硝酸塩による糖代謝の制御において様々な組織で AMPK が重要な役割を果たしていることも明らかになった。以上より、亜硝酸塩が糖尿病の治療や予防に有用であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Miyamoto L, Yamane M, Tomida Y, Kono M, Yamaoka T, Kawasaki A, Hatano A, Tsuda K, Xu W, Ikeda Y, Tamaki T, Tsuchiya K. Nitrite Activates 5'AMP-Activated Protein Kinase-Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway in Human Glomerular Endothelial Cells. *Biol Pharm Bull.* 40, 1866-1872, 2017. (査読有)( doi: 10.1248/bpb.b17-00316.)

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) 井上陽加、宮本理人、服部真奈、池田康将、玉置俊晃、土屋浩一郎、亜硝酸塩による脂肪組織への抗肥満的影響、第 134 回日本薬理学会近畿部会、2018 年 11 月 23 日、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

(2) 中山卓、宮本理人、服部真奈、井上陽加、土屋浩一郎、 $\alpha$ -TC のグルカゴン分泌における SGLT2 阻害薬の影響、第 57 回 中国四国支部学術大会、2018 年 11 月 10 日、米子市文化ホール(鳥取県・米子市)

(3) Tsuchiya K, Nitrite exerts its physiological effects through NO-dependent and -independent manner. 10th Meeting of the Canadian Oxidative Stress Consortium (招待講演)(国際学会) 2018 年 5 月 30 日, University of Alberta, Edmonton, AB, CA

(4) 服部真奈、宮本理人、山根萌、富田洋輔、土屋浩一郎、亜硝酸塩による空腹時血糖値改善の機序の解明、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2017 年 10 月 21 日、徳島大学蔵本キャンパス(徳島県・徳島市)

(5) 土屋浩一郎、肥料、ミネラルとヒトの健康、硝酸塩の臓器保護作用、日本土壤肥料学会 2017 年度大会(招待講演)、2017 年 9 月 7 日、東北大学青葉山新キャンパス(宮城県・仙台市)

(6) 土屋浩一郎、食餌性亜硝酸塩の新たな薬理学的作用、第 17 回日本 NO 学会学術集会(招待講演)、2017 年 5 月 20 日、阿波観光ホテル(徳島県・徳島市)

(7) Tsuchiya K, Miyamoto L, Tomida Y, Yamane M, Tsuchihashi Y, Tsuda K, Ikeda Y, Tamaki T. Nitrite activates 5' AMP-Activated Protein Kinase -endothelial nitric oxide synthase pathway in human glomerular endothelial cells. 第 16 回日本 NO 学会学術集会& 第 9 回国際 NO 学会(国際学会)(2016 年 05 月 20 日~2016 年 05 月 23 日) 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 1 件)

(1) 渡辺和彦 編著、土屋浩一郎(分担執筆)、肥料の夜明け、pp.7-24、(総 232 頁) 化学工業日報社(東京) 2018.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：石澤 有紀  
ローマ字氏名：(ISHIZAWA-IZAWA, Yuki)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：AWA サポートセンター  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：40610192

研究分担者氏名：池田 康将  
ローマ字氏名：(IKEDA, Yasumasa)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：60432754

研究分担者氏名：宮本 理人  
ローマ字氏名：(MIYAMOTO, Licht)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部（薬学域）  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：60456887

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※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。