

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01872

研究課題名(和文) 糖尿病食事療法における科学的根拠の構築：各種脂肪酸によるDPP4調節機序の検討

研究課題名(英文) Scientific basis of new diet based therapy for diabetes: Relationship between fatty acids and Dipeptidyl Peptidase 4

研究代表者

角田 伸代 (Tsunoda, Nobuyo)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：60337483

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)：本研究では、糖尿病食事療法の科学的根拠構築を目的とし、*in vitro*およびマウス膵臓細胞細胞株(MIN6)にて、脂肪酸がDPP4活性に及ぼす影響について検討した。脂肪酸、中でもDHAおよびEPAは直接的DPP4活性阻害作用を有することに加え、膵臓細胞においてもDPP4活性阻害作用を有していることが示唆された。そのため、DHA、EPAのような強いDPP4活性阻害作用を示す脂肪酸は、単独、もしくはDPP4阻害薬との併用で、DPP4活性上昇の抑制を介したインスリン分泌の改善、血糖コントロールに有効である可能性を明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DPP4は、肝臓、脂肪組織、血管壁などの各分泌臓器によって調節機構が異なり、臓器間でネットワークが形成されていることが明らかにされつつあるが、まだ研究途上であり不明な点が多い。食事成分である脂肪酸によるDPP4活性調節という観点から本研究を実施したことで、DPP4活性調節を介した糖尿病患者の食事療法の科学的根拠の構築に寄与できたと考える。今後さらに研究成果を集積することで、より明確で積極的な食事面からのアプローチを通じた糖尿病患者の服薬量減少や心身の負担軽減に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) cleaves and inactivates the incretin hormones that decrease blood glucose levels. It was reported that intake of fish and EPA or DHA increases the effect of DPP4 inhibitor and improves HbA1c levels. It was also suggested that EPA or DHA may reduce DPP4 activity, however it has not been clarified. It is thus necessary to directly determine the role of fatty acids in regulating DPP4. Therefore, we examined the effect of fatty acids on DPP4 activity *in vitro* and pancreatic cells to construct an evidence for new diet-based therapy for diabetes. This study suggests that fatty acids have the potential to inhibit DPP4 activity and enhance the effect of DPP4 inhibitors. Fatty acids such as EPA and DHA, which have an especially strong inhibitory effect on DPP4 activity, may be effectively used in a new diet-based therapy for diabetes.

研究分野：栄養学

キーワード：DPP4 脂肪酸 EPA DHA 膵臓

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は我が国における生活習慣病の代表的疾患であり、その予防・治療が急務な課題となっている。我々は食事をすると、食事(特にグルコース)に反応して腸管からインクレチンという消化管ホルモンが分泌されるが、インクレチンはジペプチジルペプチダーゼ4(DPP4)という酵素によって数分で分解されてしまうことが知られる。インクレチンには、膵臓に作用してインスリン分泌を促す作用がある。DPP4阻害薬は、DPP4活性を阻害することでインクレチン分解を抑制し、インスリン分泌を促して血糖低下効果を期待する糖尿病治療薬である。

近年この薬剤作用を魚摂取が増強するとの研究成果が蓄積しつつある。主要な魚油成分であるエイコサペンタエン酸(EPA)の血清濃度が高い糖尿病患者でDPP4阻害薬がより有効であったとする報告¹⁾や、魚、EPA、ドコサヘキサエン酸(DHA)の摂取量とDPP4阻害薬使用時の血清HbA1cの変化に負の相関が認められたとする報告²⁾がなされている。しかし、EPAや魚摂取により、なぜ薬剤作用が増強されるのか、その効果にDPP4が関連しているのかといった機序は明確ではない。

DPP4はアディポサイトカインのひとつとして提唱されており³⁾、脂肪細胞が主要な産生組織のひとつである。先行研究により、脂肪細胞では、通常状態において血糖値が上昇するとDPP4分泌は低下するが、糖尿病状態においては血糖値が上昇してもDPP4分泌の上昇することが報告されている⁴⁾。この機序として、糖尿病になると脂肪細胞にインスリン抵抗性が生じ、細胞内は血糖値が低下した状態となることが起因している可能性が示唆されている。魚油にはインスリン抵抗性改善効果のあることが多くの研究において示されているため、脂肪細胞におけるインスリン抵抗性改善効果が、前述したDPP4阻害薬作用増強の一因である可能性が考えられる。よって、DPP4阻害薬の作用増強効果には、DPP4の寄与の大きい可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、各種脂肪酸によるDPP4活性調節を通じた糖尿病食事療法の科学的根拠の構築を目的とし、DPP4の主要産生組織である脂肪細胞株を用い、各種脂肪酸によるDPP4活性調節機序および糖・脂質代謝調節機序について検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* において脂肪酸がDPP4活性に及ぼす影響の検討

DPP4活性測定

DPP4活性は、DPPIV-Glo™ Protease Assay (Promega)を用い、10ng/ml(116nM)DPP4(Ser29-His760)に、各種脂肪酸、DPP4阻害薬、抗酸化物質などを試験内にて混合し、1時間常温放置後、発光法にて測定した。

DPP4活性調節作用と活性調節要因の検討

DPP4活性調節能に対する脂肪酸濃度の検討では、DHA(C22:6)、EPA(C20:5)、リノール酸(LA)(C18:2)、オレイン酸(OA)(C18:1)、パルミチン酸(PA)(C16:0)をそれぞれ5μM、50μM、500μM、5mMの異なる4つの濃度でDPP4と混合しDPP4活性を測定した。脂肪酸とDPP4阻害薬との相互作用の検討では、DHA、EPA、LA、OA、PA(すべて50μM)と200nMシタグリプチンリン酸塩水和物(シタグリプチン)およびDPP4を同時混合し、DPP4活性を測定した。二重結合の有無によるDPP4活性調節への影響の検討では、同数の炭素を有し、二重結合の有無が異なるDHA(C22:6)およびドコサン酸(DA)(C22:0)、エイコサン酸(EA)(C20:0)およびEPA(C20:5)(すべて50μM)をDPP4と混合し、DPP4活性を測定した。炭素数20によるDPP4活性調節への影響の検討では、同数の炭素を有し、二重結合数が異なるEPA(C20:5)、アラキドン酸(AA)(C20:4)、ジホモ-リノレン酸(DGLA)(C20:3)(すべて50μM)をDPP4と混合し、DPP4活性を測定した。抗酸化能によるDPP4活性調節への影響の検討では、500μM DHAおよび500μM EPAと抗酸化能が同等となるL(+)-アスコルビン酸および(±)-α-トコフェロールの濃度を算出し、各々を試験内でDPP4と混合しDPP4活性の測定を行った。抗酸化能は、Antioxidant Assay Kit(Cayman Chemical)を用いて測定した。

すべての検討において、脂肪酸と同量のDMSOを添加したFA(-)を対照として設けた。

(2) DPP4分泌細胞において脂肪酸がDPP4活性に及ぼす影響の検討

細胞および培養条件

細胞には、マウス線維芽脂肪株(3T3-L1)およびマウス膵臓細胞株(MIN6)を用いた。培地には10%ウシ胎児血清(FBS)、1%ペニシリンストレプトマイシン(PS)、2%重炭酸水素ナトリウムを添加したDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)を用い、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。3T3-L1細胞はコンフルエント後にAdipoInducer Reagent(TAKARA)を用いてインスリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを添加して脂肪細胞に分化させた後、MIN6細胞は7日間培養後、実験に供した。

脂肪酸およびDPP4阻害薬添加

MIN6は、DMEM(FBS+,PS+)で7日間培養した後、脂肪酸および1%BSA(脂肪酸不含)を加えたDMEM(FBS-,PS+)で24時間培養(37℃、5%CO₂)した。

脂肪酸添加は、500μM PAの単体添加および500μM PAのうち50μMをDHA、EPA、AA、DGLA、

LA、OA に置換した添加を行った。対照として脂肪酸未添加 (FA (-)) を設けた。DPP4 阻害薬添加は、500 μ M PA および 450 μ M PA + 50 μ M EPA の各々に、100 μ M のシタグリプチンを同時添加して行った。対照として脂肪酸と同量の DMSO を添加した FA (-) を設けた。

グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) アッセイ

GSIS アッセイには高グルコース DMEM (25mM D-Glucose)、低グルコース DMEM (5.6mM D-Glucose) の 2 種類を用いた。添加および培養 24 時間後、低グルコース DMEM にて 60 分培養した。その後、高グルコース DMEM に置換し 60 分培養後、培地を全量採取した。細胞は溶解し、遠心後上清を採取した。培地および細胞溶解液上清における DPP4 活性およびインスリンレベルは、細胞溶解液上清中のたんぱく定量値を用いて補正を行った。

DPP4 活性測定

DPPIV-Glo™ Protease Assay (Promega) を用い、発光法にて DPP4 活性の測定を行った。培地に遊離した DPP4 を血清遊離型 DPP4、細胞溶解液上清から得られた DPP4 を膜貫通型 DPP4 とし、それぞれ測定を行った

インスリンレベルの測定

培地中インスリンレベルは、レビスインスリン-マウス T (富士フィルム和光純薬) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* において脂肪酸が DPP4 活性に及ぼす影響の検討

各種脂肪酸の DPP4 活性調節作用および濃度依存性の検討を行ったところ、すべての脂肪酸において、FA (-) と比較して DPP4 活性の低下が見られたが、その作用は DHA、EPA で特に顕著であった。加えて DHA、EPA では濃度依存性を示した。DPP4 阻害薬との相互作用について検討したところ、すべての脂肪酸において、DPP4 阻害薬単体および脂肪酸単体添加と比較し、両方の同時添加時に相加作用が見られた。これらの結果から、代謝等の外部要因の影響を受けない *in vitro* 条件下においては、DHA、EPA は特異的に強い DPP4 活性阻害作用を有し、その作用は DPP4 阻害薬との併用で強められることが示唆された。

DHA や EPA でみられた強い DPP4 活性阻害作用が、二重結合の多さに起因するかについて検討を行った。その結果、FA (-) と比較し、炭素数 22 で二重結合を 6 つ有する DHA は 40% まで DPP4 活性を阻害したが、DHA と同炭素数で二重結合を有さない DA では 10% の DPP4 活性阻害作用しか見られなかった。同様に、炭素数 20 で二重結合を 5 つ有する EPA においても 10% まで DPP4 活性を阻害したが、EPA と同炭素数で二重結合を有さない EA では DPP4 活性阻害作用はなかった。しかしながら、DHA と EPA を比較すると、二重結合数の少ない EPA で有意に強い DPP4 活性阻害作用を示した。二重結合の有無に加えて、炭素数 20 の EPA でより強い DPP4 阻害作用を示したことから、炭素数 20 の脂肪酸に着目し、二重結合数の影響について検討を行った。その結果、EPA、AA、DGLA のすべてにおいて、FA (-) に比較し、有意な DPP4 活性阻害作用を示し、その作用は脂肪酸の有する二重結合数が多いほど有意に強かった。しかし、二重結合数が 4 つの AA は、二重結合数が 6 つの DHA とほぼ同等の DPP4 活性阻害作用であった。これらの結果から、二重結合の有無が DPP4 活性阻害作用を決定するひとつの要因であるとともに、鎖長もしくは炭素数 20 の脂肪酸において、その作用は特に強い可能性が示唆された。

二重結合のもつ抗酸化作用が DPP4 活性に及ぼす影響について検討を行った。DPP4 活性は、FA (-) と比較し、DHA で有意に 10% まで低下したが、同等の抗酸化能を示す濃度に設定した L(+)-Ascorbic Acid と (±)- α -Tocopherol では有意な低下は見られなかった。EPA においても同様の結果であった。これらの結果から、抗酸化能が DPP4 活性阻害作用を調節する要因である可能性は低いと考えられたが、L(+)-アスコルビン酸、(±)- α -トコフェロール以外の抗酸化物質で DPP4 活性阻害を示す可能性があるため、DPP4 活性に及ぼす抗酸化能の影響に関しては更なる検討が必要である。

(2) DPP4 分泌細胞において脂肪酸が DPP4 活性に及ぼす影響の検討

当初の目的通り、まず脂肪細胞において脂肪酸が DPP4 活性に及ぼす影響について検討を行うため、3T3-L1 における DPP4 活性量検討のための実験系確立に取り組んだ。しかし、3T3-L1 における DPP4 活性は非常に低く、検討を行うことが困難であった。Tumor necrosis- α による炎症誘導も行ったが、DPP4 活性はほとんど上昇しなかった。

脂肪細胞にかわり、インクレチンの標的臓器でありインスリンの分泌臓器でもある膵臓に着目し、膵臓細胞株である MIN6 を用いて検討を行うことを考えた。この細胞では DPP4 の分泌が確認されており⁵⁾、本研究でも実験を行うことができる分泌量を検出することができた。そのため、脂肪酸が DPP4 活性に及ぼす影響について、MIN6 にて検討を行った。培地中のインスリンレベルは、FA (-) と比較し、PA 添加で 60% まで有意に低下した。PA の一部を LA、OA に置換してもインスリンレベルの上昇は見られなかったが、DHA および EPA に置換したところ、インスリンレベルは上昇した。培地中遊離型 DPP4 活性は、FA (-) と比較し、PA 添加で 170% にまで有意に上昇した。PA の一部を LA、OA に置換しても DPP4 活性は上昇したままであったが、DHA

および EPA に置換すると、FA(-)と同様の値まで低下した。これら培地中遊離型 DPP4 活性は、インスリンレベルと逆の変化を示した。一方、細胞膜貫通型 DPP4 活性は、インスリンレベルに関わらず、どの脂肪酸添加時にも、有意な変化は見られなかった。これらのことから、DHA、EPA は膵臓細胞において、低下したインスリン分泌と培地中遊離型 DPP4 活性を改善する作用を有することが示唆された。

in vitro で最も DPP4 活性阻害作用の強かった EPA を用い、DPP4 阻害薬との同時添加を行い相互作用について検討を行った。インスリンレベルは FA(-)群に比べ PA 添加で有意に低下したが、PA の一部を EPA に置換あるいは PA に DPP4 阻害薬を添加したところ、どちらにおいてもインスリンレベルは上昇し、PA に EPA と DPP4 阻害薬の両方を同時添加すると有意な上昇がみられた。培地中遊離型 DPP4 活性は FA(-)群に比べ PA 添加で有意に上昇したが、PA の一部を EPA に置換あるいは PA に DPP4 阻害薬を添加したところ、どちらにおいても低下し、PA に EPA と DPP4 阻害薬の両方を同時添加すると有意な低下がみられた。これらのことから、EPA と DPP4 阻害薬は別の作用機序を介して細胞に作用し、併用することで DPP4 活性阻害作用は強められることが示唆された。

以上より、脂肪酸は直接的 DPP4 活性阻害作用を有することに加え、膵臓細胞においても DPP4 活性阻害作用を有していることが示唆された。そのため、DHA、EPA のような強い DPP4 活性阻害作用を示す脂肪酸は、単独、もしくは DPP4 阻害薬との併用で、DPP4 活性上昇の抑制を介したインスリン分泌の改善、血糖コントロールに有効である可能性を明らかにできた。

DPP4 は、肝臓、脂肪組織、血管壁などの各分泌臓器によって調節機構が異なり、臓器間でネットワークが形成されていることが明らかにされつつあるが、まだ研究途上であり不明な点が多い。食事成分である脂肪酸による DPP4 活性調節という観点から本研究を実施したことで、DPP4 活性調節を介した糖尿病患者の食事療法の科学的根拠の構築に寄与できたと考える。今後さらに研究成果を集積することで、より明確で積極的な食事面からのアプローチを通じた糖尿病患者の服薬量減少や心身の負担軽減に貢献できることが期待される。

< 引用文献 >

- 1) Senmaru T, Fukui M, et al, Dipeptidyl-peptidase IV inhibitor is effective in patients with type 2 diabetes with high serum eicosapentaenoic acid concentrations, J Diabetes Investig, 3(6):498-502, 2012
- 2) Iwasaki M, Hoshian F, et al, Predicting Efficacy of Dipeptidyl peptidase-4 Inhibitors in Patients With Type 2 Diabetes: Association of Glycated Hemoglobin Reduction With Serum Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Levels, J Diabetes Investig, 3(5):464-467, 2012
- 3) Lamers D, Famulla S, et al, Dipeptidyl Peptidase 4 Is a Novel Adipokine Potentially Linking Obesity to the Metabolic Syndrome, Diabetes, 60(7):1917-1925, 2011
- 4) Shankar DS, Hayashi H, et al, Regulation of Dipeptidyl Peptidase 4 Production in Adipocytes by Glucose, Diabetes Metab Syndr Obes, 7:185-194, 2014
- 5) Omar BA, Liehua L, et al, Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-4) Is Expressed in Mouse and Human Islets and Its Activity Is Decreased in Human Islets From Individuals With Type 2 Diabetes, Diabetologia, 57(9):1876-1883, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川崎敦史、角田伸代
2. 発表標題 魚油成分のDPP4活性調節機序に関する検討
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川崎敦史、角田伸代
2. 発表標題 EPA、DHAによるDPP4活性調節機序に関する検討
3. 学会等名 第64回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川崎 敦史 (Kawasaki Atsushi)		
研究協力者	斉藤 優 (Saito Yu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	亀山 彩恵 (Kameyama Sae)		
研究協力者	加藤 璃子 (Kato Riko)		
研究協力者	後藤 慧 (Goto Satoi)		