

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：94313

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11711

研究課題名(和文) 生体の炭水化物量の多寡が骨格筋の代謝に及ぼす影響の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the effects of gross carbohydrate content on skeletal muscle metabolism

研究代表者

浜本 芳之 (Hamamoto, Yoshiyuki)

株式会社関西メディカルネット(関西電力医学研究所)・糖尿病研究センター代謝・栄養研究部・部長

研究者番号：50390787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内炭水化物の多寡が骨格筋や肝臓代謝に及ぼす影響について検討するため、SGLT2欠損マウスを用いて、通常餌(SC;炭水化物57.9%)と低炭水化物餌(LC;20.9%)で実験を行った。自由摂餌下では相対的に高脂肪食になり総摂取エネルギーが増加するLC群で体重増加(肥満)し耐糖能が悪化したが、尿糖排泄するSGLT2欠損マウスでは耐糖能が保たれた。一方、Pair-feedingで摂取エネルギーをSC・LCで同等に揃えると、むしろSGLT2欠損マウスでのみLC群で腹腔内脂肪の増加を伴う体重増加が見られ、炭水化物制限と尿糖排泄が併存すると脂肪蓄積に働くことが示された。骨格筋は遺伝子変化が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低炭水化物ダイエットが流行し、糖尿病治療薬としてSGLT2阻害薬が臨床応用されている現在、摂取炭水化物制限と尿中糖排泄促進を同時に行った際に、臓器レベルの代謝調節機構や全身の代謝にどのような影響をもたらすかは明らかでない。同様条件下で臨床的に正常血糖ケトアシドーシスを発症するリスクが知られているが、慢性的な影響は体重への影響ですら明確ではないため、明らかにすることは喫緊の課題である。特に肝臓における糖新生や脂肪代謝、骨格筋における糖代謝やアミノ酸代謝を解明し、長期的な低炭水化物食やSGLT2阻害薬の全身・臓器代謝への影響を詳らかにすることは、高齢社会を迎えた我が国の健康寿命延伸にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of net amount of carbohydrate in the body on metabolism in skeletal muscle and liver, SGLT2-deficient mice which show increased urinary glucose excretion were fed a normal diet (SC; 57.9% carbohydrate and 28.9% protein) and a low carbohydrate diet (LC; 20.9% carbohydrate and 28.3% protein). Under ad libitum feeding, LC resulted in increased total energy intake with a relatively high fat diet, mice gained weight and deteriorated glucose tolerance, but the loss of SGLT2 preserved glucose tolerance. On the other hand, when energy intake was equalized in the SC and LC groups using pair-feeding method, only SGLT2-deficient mice showed increased body weight with increased intraperitoneal fat in the LC diet group, suggesting that concomitant carbohydrate restriction and increased urinary glucose excretion result in fat accumulation. Slight changes in gene expression were observed in skeletal muscle.

研究分野：代謝栄養学

キーワード：炭水化物 尿糖排泄 糖新生 骨格筋

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究背景

超高齢社会を迎えつつある我が国では、加齢に伴う糖尿病や脳梗塞などの疾病、認知症の増加などに加え、サルコペニアなどによる運動機能の低下が QOL の低下、健康寿命の短縮をきたすことから、高齢者における骨格筋量・筋力の維持は重要な課題である。筋肉の維持には、適切なアミノ酸やブドウ糖、ビタミンなどの栄養、インスリンやテストステロンなどのホルモン、運動刺激が重要である。栄養はサルコペニアの予防に最も重要な要素のひとつであるが、適切な総エネルギーの議論に加え炭水化物や蛋白質の適切な摂取比率の科学的根拠は確立していない。

筋肉を対象とする栄養療法は蛋白質のみに焦点が当たりがちであるが、炭水化物も生体エネルギー代謝の根幹をなす生命維持に必須の最も重要な栄養素である。近年の健康ブームから極端な炭水化物制限が注目されているが、短期的にはケトシスや低血糖を引き起こす危険性があるほか、長期的に継続することの生体への影響はいまだ不明である。さらに糖尿病治療薬として、血糖とは無関係に尿糖排泄を促進する **sodium-glucose co-transporter (SGLT) 2** 阻害薬が臨床応用されたが、尿糖排泄を促進した際の骨格筋、肝臓など全身臓器の代謝変化には不明な点が多い。

炭水化物制限食の体重や血糖に関する臨床的な検討としては、肥満者を対象にそれぞれの栄養素を **30%**減じた低脂質食あるいは低炭水化物食の検討(1)や、低炭水化物食と不飽和脂肪酸に富む地中海料理の体重や代謝系因子に対する影響の検討(2)などが報告されている。また、**2018**年にアメリカの地域住民コホート研究で、炭水化物比率が総エネルギー比 **50-55%**の群が最も死亡率が少なかったとの報告(3)されるなど、栄養素比率と代謝・寿命の関係に関する研究は、注目の分野である。動物実験では、低炭水化物餌と **SGLT2** 阻害薬投与により肝臓・腎臓に於ける糖新生とグリコーゲン量が減少したという国内からの報告(4)があるほか、学会報告で同様に低炭水化物餌や **SGLT2** 阻害薬を投与し、肝臓や腎臓に置ける代謝変化を検討した報告がある。

2. 研究の目的

従来、日本人は欧米人と比較して炭水化物摂取量が多いとされてきた。一方で、近年、肥満治療や糖尿病治療において、炭水化物摂取比率を極端に制限した低炭水化物食が注目されるようになり、糖尿病の食事療法における栄養素推奨摂取比率について議論がなされている。

低炭水化物食は相対的に高蛋白・高脂質食となる。栄養素の摂取比率は、直接的な栄養素としての蛋白質・脂質・糖質それぞれの代謝による影響のみならず、中枢における食欲や代謝調節などへの影響や、インスリンやグルカゴン、インクレチン分泌にも変化を及ぼし、これらを介して標的臓器の代謝へも影響する可能性がある。インスリンは膵細胞から分泌され、肝臓、骨格筋や脂肪細胞に糖取り込みを促進し血糖値を低下させる一方、グルカゴンは、膵細胞から分泌され、主として肝臓に作用し、糖新生促進やグリコーゲンの分解を介して血糖値を上昇させるほか、最近の研究ではアミノ酸代謝の調節因子として作用していることが解明されつつある。摂取炭水化物量を極端に制限すると、インスリンやグルカゴン、インクレチンなどの分泌変化を介して、肝臓における糖新生や脂肪代謝、脂肪組織における脂肪代謝、骨格筋における糖代謝やアミノ酸代謝が変化することが考えられる。実際、低炭水化物食は急性効果としては糖尿病患者の血糖上昇を抑制する一方、動物実験による長期的低炭水化物食ではインスリン抵抗性がかえって増大した報告もある(5)。

一方、ナトリウム依存性糖輸送担体の阻害剤である **SGLT2** 阻害薬が開発され、糖尿病治療に臨床応用された。**SGLT2** 阻害薬はインスリン作用とは無関係に尿細管の **SGLT2** 活性をほぼ **100%** 阻害し、尿糖の再吸収抑制を介した強制的尿糖排泄により血糖を低下させるため、ほとんどの糖尿病患者で一定の血糖低下とエネルギー喪失による体重減少が期待できる。さらに、最近の大規模臨床試験において、**SGLT2** 阻害薬は動脈硬化性疾患を抱えた心血管リスクの高い糖尿病患者の心血管イベント発生や心血管死を減少させるのみならず、非糖尿病を含む心不全患者や慢性腎臓病患者においてもイベント発生リスクを軽減することが報告され、その有効性に注目が集まっている。しかし一方で、**SGLT2** 阻害薬はしばしば空腹時血糖やケトン体の上昇が認められ、摂取炭水化物が少ないと骨格筋からグルコース供給源としてアミノ酸が動員され筋肉量の減少をきたし、サルコペニアなどの病態を惹起する恐れが想定される。実際、**SGLT2** 阻害は、膵細胞でのグルカゴン分泌を促進し(6)、肝臓での糖新生を促進する(7)ことが報告されているほか、長期的使用により体重減少とともに筋肉量が減少しているデータが散見され、骨折の増加も懸念されている(8)。この **SGLT2** 阻害薬を低炭水化物食の代替にしたり、さらなる体重減少効果を期待して炭水化物制限食と併用したりされているが、炭水化物制限と尿糖排泄促進の代謝に及ぼす影響は異なることが予想され、両者を共存させた際の血中あるいは各臓器の糖質・蛋白動態など代謝に与える影響は不明な点が多い。したがって、摂取炭水化物を制限したり、尿中への糖排泄を促進したりすることが、生体内においてインスリンやグルカゴン、インクレチンなどのホルモン分泌をどのように変化させ、臓器レベルの代謝にどのように影響を及ぼすのか、さらにそ

これらの臓器レベルでの分子機構にどのような変化をもたらすのかを明らかにすることは、医学的、医療的な観点から極めて重要であり、かつ急務である。そこで本研究では、摂取炭水化物量を変化させること、および尿糖排泄促進させることにより、生体における炭水化物量が変化することが臓器レベルでどのような代謝変化をもたらすかについて、特に骨格筋を中心に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

【動物】実験動物として、SAMP10 マウスの系統で遺伝的に SGLT2 の C 端領域が欠落し SGLT2 機能不全をきたす自然発症の SGLT2 欠損モデルマウス(SGLT2^{-/-})とその対照マウス(SGLT2^{+/+})を用いて実験を行った。

【投与餌】摂取総エネルギーに対する炭水化物比率を、通常餌(SC;炭水化物比率 57.9%、蛋白質比率 28.9%)と低炭水化物にした餌(LC;同 20.9%、28.3%)を投与し比較検討した。

4. 研究成果

8週齢のそれぞれのマウスに SC、および LC を 4 週間、自由摂餌下で投与したところ、摂餌量(エネルギー)は LC の方が約 1.2 倍多くなった。その結果、4 週間後には SC と比較し LC で体重が有意に増加したが、対照マウスでは耐糖能が悪化したのに対し、SGLT2 欠損マウスでは耐糖能は保たれた(図 1)。その際のブドウ糖負荷に対するインスリン分泌、および血中 GIP 分泌反応は両マウス群とも LC で増加したが、SGLT2 欠損マウスでは軽微であった。臓器遺伝子発現の検討では、対照マウスで肝臓における糖新生関連遺伝子の低下と、グルコキナーゼなど解糖系酵素の遺伝子発現上昇が見られ、筋肉では GLUT4、UCP3、PGC-1 などの遺伝子発現に変化が見られなかったのに対し、SGLT2 欠損マウスでは、肝臓における GLUT2、PEPCK の著明な遺伝子発現低下が見られ、筋肉においても GLUT4、UCP3 の遺伝子発現低下が見られた。

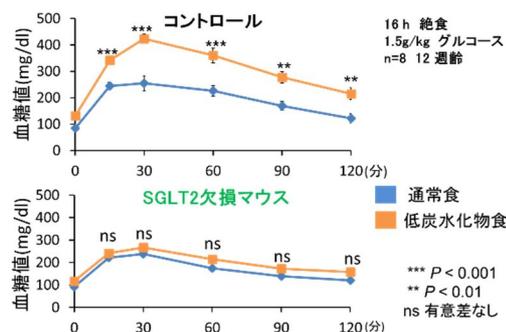


図 1:OGTT による耐糖能検査

これらの結果より、LC は自由摂餌下では摂取量が増加することに加え、相対的高脂肪食により GIP が増加することで肥満が惹起され、通常マウスではインスリン抵抗性が增大するが、SGLT2 欠損マウスでは尿糖排泄亢進により体重増加は軽微に留まり、インスリン抵抗性も軽微な上昇に留まったと考えられた。遺伝子発現変化については、自由摂餌下では低炭水化物であっても摂取量増加で賄ったため、結果的に通常マウスではインスリン抵抗性の増大と血糖上昇、肝細胞の脂肪蓄積の影響により、解糖系の亢進、糖新生の軽度抑制につながったのに対し、SGLT2 欠損マウスでは、尿糖排泄が亢進した結果、全身の Net glucose が低下し、肝臓では GLUT2 発現低下や PEPCK の遺伝子発現低下につながり、筋肉においても GLUT4、UCP3 が低下したと考えられた。

自由摂餌条件下では、SC と LC で摂取総エネルギーが異なってしまうが故に、低炭水化物食の効果を検討するというより相対的高脂肪食の効果を検討してしまうことになり、本来の研究目的に沿わない結果となった。そこで、それぞれのマウスに SC、LC 餌を Pair-feeding し総カロリーを同等に揃えて摂餌させた。

Pair-feeding によると 12 週以上両マウスとも体重が SC・LC 同等に推移し耐糖能異常も認めなかったが、15~17 週後から SGLT2 欠損マウスで SC、LC 間で体重差が生じた(図 2)。

耐糖能の差異がどの時点で起きているかを検討すべく、Pair-feeding 4・8・12・16 週で OGTT・IPGTT による耐糖能評価を行った。両マウスとも SC・LC 間で 4・8 週は差がなかったが 12 週で差が現れ始め、16 週で LC 群の耐糖能が悪化した。その際の空腹時の血糖値、グルカゴン、GIP が SGLT2 の有無に関わらず LC 群で増加していたが、特に自由摂餌下では LC 群で対照マウスにおいて肥満や耐糖能悪化が見られたのに対し、Pair-feeding ではむしろ SGLT2 欠損マウスの耐糖能が悪化していた(図 3)。SGLT2 欠損マウスの LC 群のインスリン分泌は対照マウスに比し増加傾向を示しており、IPITT によるインスリン感受性が低下していた。また、IPITT のグルカゴンの反応は、SGLT2 欠損マウスで大きく、いずれのマウスでも SC 群に比べ LC 群で高値であった。単離膵島のバッチインキュベーション法による、ブドウ糖および GLP-1、GIP に対するインスリン分泌反応を検討したが、いずれの群にも差異は認めなかった。両マウスとも LC 群で GIP 分泌亢進を認めた。

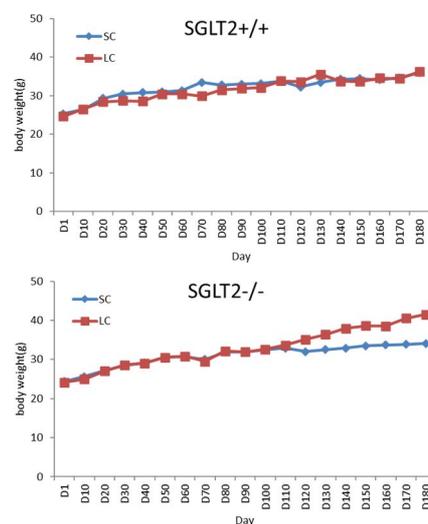


図2:体重変化

SGLT2 欠損マウスで SC、LC 間で体重差が顕著になる 24 週時点で、褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞比を検討すると、LC 群で褐色/白色脂肪細胞比が減少していた(図 4)。また、肝臓重量は対照マウスが LC 群で増加したのに対し、SGLT2 欠損マウスでは逆に低下していた。四肢骨格筋重量は SGLT2 欠損マウスの LC 群で低下傾向であったが有意差はなかった。

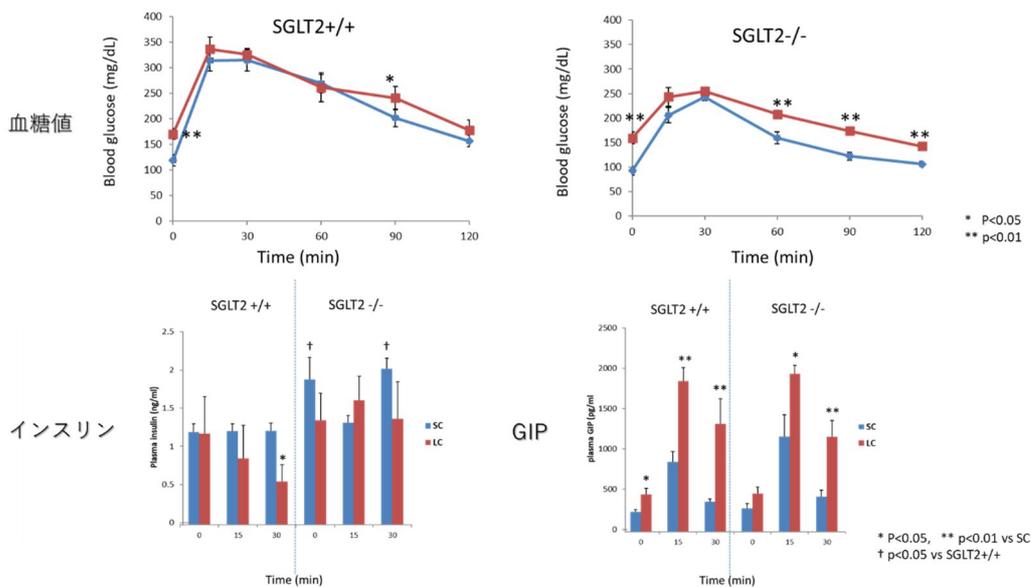


図3:経口ブドウ糖負荷検査

この自由摂餌と Pair-feeding で SGLT2 欠損の有無が脂肪蓄積や耐糖能に逆の影響を及ぼす興味深い現象のメカニズムを解明すべく遺伝子発現や代謝物測定による検討を行った。

遺伝子発現の検討では、肝臓において LC 群で両マウスともに GLUT2、GCK が発現上昇したのに対し、PEPCK は対照マウスで低下、SGLT2 欠損マウスでは増加していた。また、白色脂肪細胞において対照マウスで UCP1 が発現・増加したが、SGLT2 欠損マウスでは発現はほぼ認めなかった。筋肉では GLUT4 は発現に差がなかったが、両マウスともに LC 群で PGC-1 の遺伝子発現低下傾向が見られた(図 5)。

以上の結果より、総エネルギー量を一定に規定した場合の食事の炭水化物量の制限は、むしろ SGLT2 欠損による尿糖排泄亢進状態において白色脂肪の蓄積に働き、代謝の低下をきたす事が示唆された。

血中、肝臓の代謝物測定の結果では、SGLT2 の有無や餌の違いは血中、および肝臓において各アミノ酸レベルに影響が見られなかった。しかし肝臓での Glutathione(トリペプチド)は SGLT2-/-において餌の違いにかかわらず SGLT2+/+に比べ減少していた。還元型 Glutathione には差がなかった。さらに糖代謝関連の代謝物において、SGLT2 の有無にかかわらずピルビン酸、乳酸が LC で増加しており、糖新生経路の Fructose1,6-BisP, Fructose-6-P, Glucose-6-P も LC で上昇していた。また、特に SGLT2-/-において LC で Glycerol 3-Phosphate が増加していたが、ATP、NAD、NADH は SGLT2+/+では LC で低下していたのに対し、SGLT2-/-では SC よりむしろ LC で増加していた。LC ではインスリンは低下しグルカゴンは増加するのにも関わらず、血中ケトン体は SGLT2+/+で血中 3-OHBA が低下していたが SGLT2-/-では餌による変化がなかった。

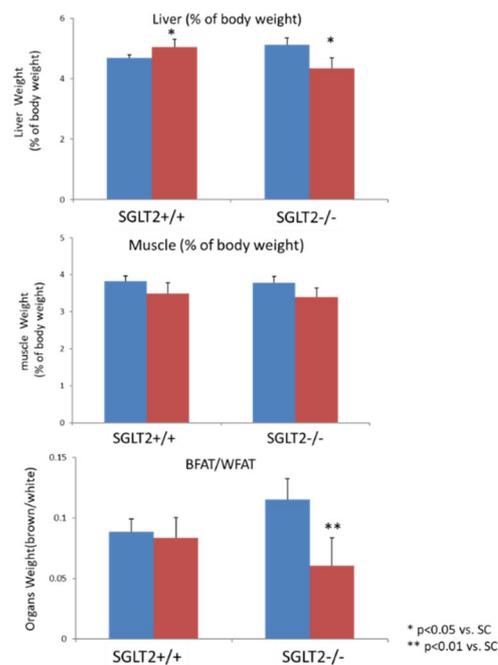


図4:肝臓・筋肉・脂肪細胞(褐色/白色脂肪細胞比)の重量

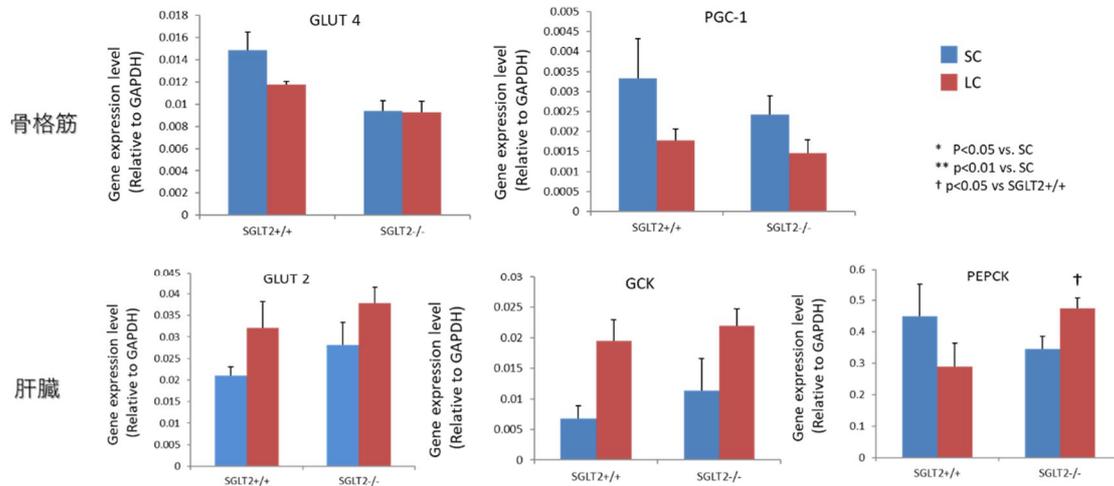


図5:骨格筋・肝臓での遺伝子発現

<引用文献>

1. Hall KD, Bemis T, Brychta R et al. Calorie for Calorie, Dietary Fat Restriction Results in More Body Fat Loss than Carbohydrate Restriction in People with Obesity. *Cell Metabolism*, 427-436, 2015.
2. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y et al. Weight Loss with a Low-Carbohydrate, Mediterranean, or Low-Fat Diet. *NEJM*, 229-241, 2008.
3. Seidelmann SB, Claggett B, Cheng S et al. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis *Lancet*, e419-428, 2018.
4. Atageldiyeva K, Fujita Y, Yanagimachi T, et al. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor and a Low Carbohydrate Diet Affect Gluconeogenesis and Glycogen Content Differently in the Kidney and the Liver of Non-Diabetic Mice. *PLOS ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157672>, 2016.
5. Handa K, Inukai K, Onuma H et al. Long-Term Low Carbohydrate Diet Leads to Deleterious Metabolic Manifestations in Diabetic Mice. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104948>, 2014.
6. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med*. 21(5):512-7, 2015.
7. Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *JCI*. 61(9):2199-2204, 2012.
8. Neal B, Perkovic V, Mahaffey K et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 377(7):644-657, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 韓桂栄、浜本芳之、横井伯英、木戸良明、清野裕、清野進
2. 発表標題 SGLT2欠損状態における低炭水化物食摂取が耐糖能、血糖調節ホルモンに及ぼす影響の解明 -SGLT2変異SAMP10マウスを用いた検討-
3. 学会等名 第34回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------