

令和 5 年 7 月 31 日現在

機関番号：92648

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20173

研究課題名(和文) 腸管腔内ポリアミンのインスリン分泌機序の解明 糖尿病予防へのアプローチを目指して

研究課題名(英文) Involvement of colon-luminal polyamines in insulin secretion. An approach to the prevention of diabetes mellitus

研究代表者

生田 かよ (Ikuta, Kayo)

協同乳業株式会社研究所・研究所・研究員

研究者番号：10836232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 外因性ポリアミン、特に腸内細菌由来ポリアミンの糖尿病への影響に関する基礎的知見を検討した。出納試験の結果、腸内細菌由来ポリアミンは、食餌由来ポリアミンよりも多く、かつポリアミン減少個体においては、腸管腔内の60%程度が生体に移行することから、腸内細菌が主要なポリアミン供給源であることがわかった。高脂肪食誘導性の糖尿病モデルマウスでは、腸管組織部位特異的なポリアミン濃度増減と腸管内分泌細胞関連遺伝子発現の変動が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、正常な細胞機能の維持に不可欠なポリアミンに着目し、特に、食事に劣らないポリアミン供給源である腸内細菌由来ポリアミンの糖尿病予防への有効性を検討した初めてのものである。糖尿病モデルでみられた腸管組織中ポリアミン濃度減少を腸内細菌によるポリアミン供給で改善することができれば、腸上皮細胞健全性を維持し続けることができる可能性がある。これは糖尿病発症や進行遅延の新しいターゲットとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The effects of polyamines produced by colonic microbiota on the body and diabetes mellitus were investigated. In the balance test, feces contained a larger amount of polyamines than the amount of dietary polyamines. When stable isotope-labeled polyamine was injected into the colon lumen, about 60% of the administered amount was transferred to the body by polyamine depletion treatment. In the high-fat diet induced diabetic mouse model, changes in intestinal tissue site-specific polyamine concentration and intestinal endocrine cell-related gene expression were observed.

研究分野：栄養学

キーワード：ポリアミン 腸内細菌 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

肥満や糖尿病患者では、病態進行に伴って腸内細菌叢のバランスが乱れることが報告されており、腸内細菌叢由来の物質が肥満や糖尿病病態に関与している可能性が注目されている。ポリアミンは生命活動に必須の物質であり、ヒト試験において糞便中には食事に劣らない高濃度のポリアミンが含有していることが分かっているが、その生体への作用は不明である。大腸管腔内に存在するポリアミンは腸内細菌叢により合成されることが無菌マウスを使用した実験から明らかとなっており、その濃度の上昇で寿命延伸や空間記憶学習の向上などの有益な作用が報告されている。しかしながら、腸内細菌由来ポリアミンの糖尿病進行への有効性は不明である。

2. 研究の目的

大腸管腔内ポリアミンの生体への作用および糖尿病モデルマウスにおけるインスリン分泌および糖尿病病態への影響を検討し、新しいアプローチ方法としての腸内細菌由来ポリアミンの有効性を探索する。

3. 研究の方法

・大腸管腔内ポリアミンの生体への作用

雄性 ICR マウスに低ポリアミン食を与え、24 時間の出納試験を実施した。食事摂取量および糞便排泄量からポリアミン出納を算出した。食事中および糞便中ポリアミン濃度は UPLC により測定した。麻酔下で、大腸管腔内に安定同位体ラベル化ポリアミンを投与し、投与後 1 時間のサンプルを採取し、生体への移行を検討した。また生体内ポリアミン減少処理を 1 週間行い、その時の生体移行も同様に検討した。腸内細菌によるポリアミン消費を考慮するため、盲腸内容物を採取し、安定同位体ラベル化ポリアミンを添加後、37°C 嫌気環境下で 1 時間振盪培養し、腸内細菌によるポリアミン消費率を算出した。安定同位体ラベル化ポリアミンは GC-MS を使用して測定した。

・超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスの生体ポリアミンおよび腸管上皮細胞への影響

雄性 B6D2F1 マウス(日本 SLC)の 4 週齢を購入し、5 週齢より超高脂肪食(60kcal% High fat diet; research diet)もしくは通常食(10kcal% fat diet)で飼育した。各飼料で 21 週間飼育後、解剖しサンプル採取した。組織中ポリアミン濃度および腸管内分泌細胞関連遺伝子および腸管上皮遺伝子発現を UPLC および逆転写定量 PCR により測定した。

・超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスへの腸内細菌由来ポリアミン合成誘導による糖代謝への影響

雄性 B6D2F1 マウス(日本 SLC)の 4 週齢を購入し、5 週齢より超高脂肪食 (60kcal% High fat diet; research diet)で飼育した。マウスをビフィズス菌 LKM512 とアルギニン投与群 (LKM512+Arg)と対照群 (Control)の 2 群に分け、各溶液を週 3 回投与した。投与開始 1 週間後の糞便を採取し、UPLC にてポリアミン濃度を測定した。高脂肪食開始後、10 週目および 16 週目でグルコース負荷試験 (OGTT)を行った。前日 13 時に各溶液を投与し、14 時から絶食を開始した。当日 9 時半に体重測定および OGTT 開始前採血を行い、10 時に D-グルコース溶液を経口投与し、投与後 15 分、30 分、60 分、120 分の血液を尾静脈より採取した。D-グルコースは 2g/kg B.W.となるように負荷し、血液はヘパリン処理後遠心分離 (4°C、3000×g、15min)し、血漿を採取した。血漿グルコース濃度はラボアッセイグルコース (wako)、血漿インスリン濃度はマウス/ラットインスリン測定キット(株式会社森永生科学研究所)で測定した。

・超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスへの腸内細菌由来ポリアミン合成誘導直前投与による糖代謝への影響

16 週間の高脂肪食負荷および各溶液を投与した B6D2F1 マウスを用いて、OGTT 開始 2 時間前投与での糖代謝への影響を OGTT で評価した。すなわち、食前摂取による血糖値上昇の予防効果を調べた。5 時間の絶食後、LKM512+Arg あるいは PBS (Control)を投与し、2 時間後に OGTT を実施した。採血は、各溶液投与前(-120 分)、OGTT 前(0 分)、OGTT 後 15 分、30 分で行った。血液は、各キットを使用して測定した。

・超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスへの腸内細菌由来ポリアミン合成誘導単回投与による糖代謝への影響

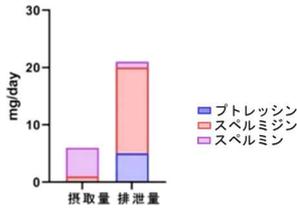
上記高脂肪食負荷 Control マウスを用いて、OGTT2 時間前の LKM512+Arg 単回投与による効果を検討した。まず始めに、5 時間絶食させた後に PBS を投与し、2 時間後に OGTT を実施した。その 4 日後、再び 5 時間絶食させ、LKM512+Arg を投与し、その 2 時間後に OGTT を実施した。

4. 研究成果

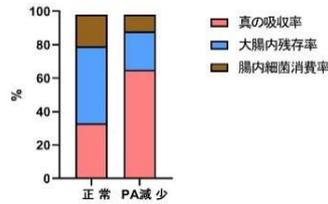
・大腸管腔内ポリアミンの生体への作用

マウス 24 時間出納試験の結果、食餌摂取量と比較して糞便中により多くのポリアミン排出がみられた。特に、プトレッシンとスペルミジンが糞便中に多く含有していた (a)。また大腸管腔内に安定同位体ラベル化ポリアミンを投与し、投与後 1 時間での生体移行を確認したところ、正常時では投与量の 30% 程度、ポリアミン減少処理時では投与量の 60% 程度が大腸から生体へ取り込まれていることが明らかとなった (b)。インスリン分泌に関連する腸管内分泌細胞への影響を想定し、腸管部位別に腸管腔内から腸組織へのポリアミン移行を検討したところ、投与後 1 時間で大腸組織での取り込みが検出された。

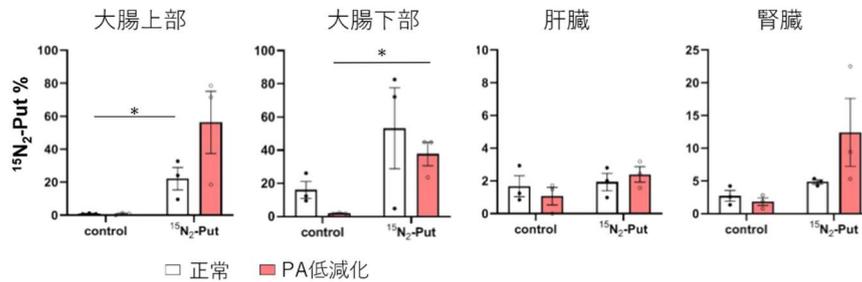
(a) 24 時間出納試験



(b) 安定同位体移行試験

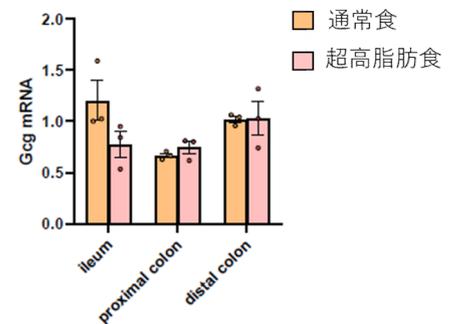


(c) 安定同位体組織移行



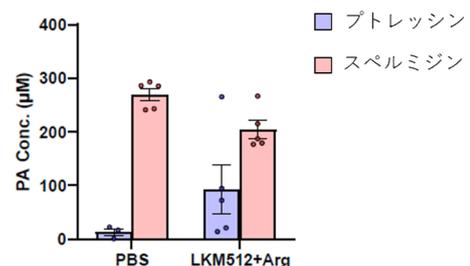
・超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスの生体ポリアミンおよび腸管上皮細胞への影響

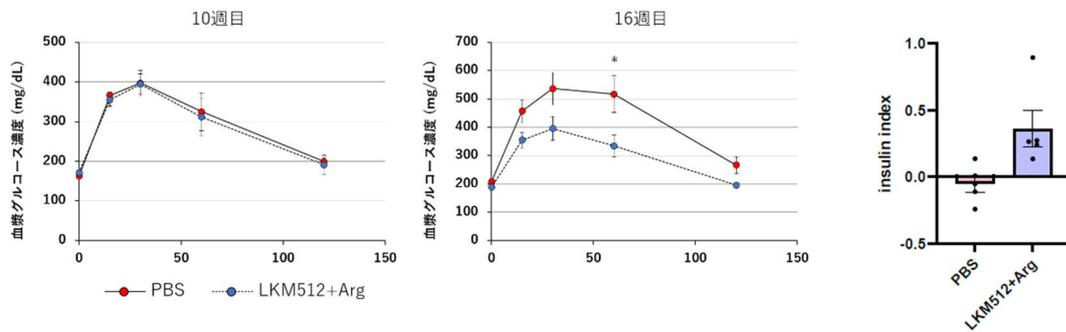
通常食群と超高脂肪食群での腸管組織中ポリアミン濃度を検討したところ、超高脂肪食群では回腸でのポリアミン濃度が高く、大腸下部組織でのポリアミン濃度が低い傾向がみられた。大腸上部においては、変化はみられなかった。腸管内分泌細胞の遺伝子発現を検討したところ、回腸では超高脂肪食群で *Gcg*, *ZO-1*, *Occludin* mRNA 発現の低下傾向がみられ、大腸下部では *INSL5* mRNA 発現の増加傾向がみられた。この結果から、腸管部位特異的な内分泌細胞関連遺伝子および腸管上皮遺伝子局在およびポリアミン濃度の変動が確認できた。



・超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスへの腸内細菌由来ポリアミン合成誘導による糖代謝への影響

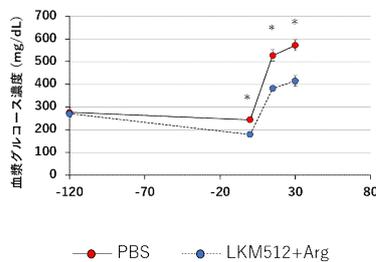
超高脂肪食負荷マウスへ LKM512+Arg もしくは PBS の投与開始 1 週間後に、各溶液投与後 3 時間半の糞便を採取し、糞中ポリアミン濃度を測定した。LKM512+Arg 投与群において、糞中ポリアミン合成増加を確認した。高脂肪食負荷開始 10 週目および 16 週目で OGTT を実施したところ、10 週目で差はみられなかったものの、16 週目では LKM512+Arg 群で有意な耐糖能改善が認められた。また、インスリン早期追加分泌指標であるインスリンインデックスを算出したところ、コントロール群と比較して LKM512+Arg 群でインスリン初期追加分泌の改善が認められた。腸内細菌由来ポリアミン合成誘導は、食餌誘発性糖尿病モデルでの糖代謝障害を予防する可能性が示された。





・ 超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスへの腸内細菌由来ポリアミン合成誘導直前投与による糖代謝への影響

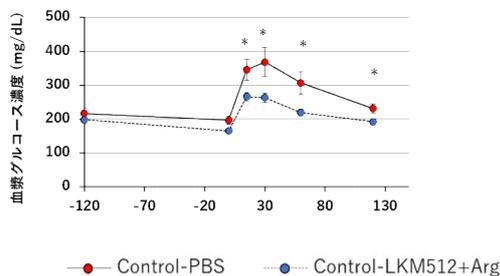
腸内細菌由来ポリアミン合成を誘導する LKM512+Arg の併用投与は、投与後 2 時間以降に大腸で合成増加することが分かっている。そこで、OGTT 開始 2 時間前に各溶液を投与し、OGTT への影響を検討したところ、LKM512+Arg 投与群では、投与後 2 時間で血糖値の有意な低下と、active GLP-1 の有意な上昇が見られた。また、LKM512+Arg 群では、OGTT 時の急激な血糖値上昇を抑制した。またインスリン濃度に関しては、コントロール群ではまったく OGTT への反応が見られないのに対して、LKM512+Arg 群では、血糖値にตอบสนองしてインスリン濃度の有意な上昇が確認された。



・ 超高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスへの腸内細菌由来ポリアミン合成誘導直前投与による糖代謝への影響

LKM512+Arg の長期的投与による菌叢変化およびポリアミン合成増加が糖代謝へ好影響を与えることが分かった。そこで、単回投与による糖代謝への影響を検討した。コントロール群のマウスを使用し、PBS (Control-PBS) もしくは LKM512+Arg (Control-LKM512+Arg) を 2 時間前に投与を行い、単回投与による糖代謝への影響を検討した。PBS 投与後 2 時間での OGTT 試験を行い、4 日間の休憩をはさんだのちに、LKM512+Arg 投与を行い、同様の試験を実施した。PBS 投与で見られた OGTT 時の血糖値推移は、LKM512+Arg の 2 時間前投与により、改善が見られ、血糖値の急激な上昇を抑制した。

(a)



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 生田 かよ, 中村 篤央, 松本 光晴
2. 発表標題 腸内細菌叢は生理活性物質ポリアミンの主要な供給源
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
---------	---------