

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24614013

研究課題名(和文) 魚油の作用機序におけるインクレチンの役割とその分泌調節による糖尿病食事療法の検討

研究課題名(英文) Application of evidence of the functional relationship between incretin and fish oil to dietary therapy for diabetes

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：魚油の作用機序に及ぼすインクレチンの役割について、in vitroおよび糖尿病患者を対象として検討を行った。

in vitroにおいては魚油に含まれる脂肪酸であるEPA、DHAにDPP4活性阻害効果がみられ、これが魚油の作用機序の一因である可能性が示唆された。このことは、DPP4阻害剤の効きをEPA、DHAによって高められる可能性も示している。糖尿病患者を対象とした研究は現在継続中で、現在までに50名の患者から本研究への同意が得られている。この解析結果が得られれば魚油摂取が及ぼすDPP4活性への影響を検証できると考える。

研究成果の概要(英文)：The functional relationship between incretin and fish oil was investigated in this study.

In the in vitro study, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are typical components in fish oil, inhibited dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) activity. This result suggested that these inhibitory effects were important contributors to the functional mechanism of fish oil, and that EPA and DHA can regulate DPP4 activity.

A study about the effect of fish oil on DPP4 activity in diabetes is underway. Fifty patients have agreed to participate in this study to date. Once the study is completed, its results can serve as evidence of the effect of fish oil intake on DPP4 activity.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：インクレチン DPP4 魚油 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

魚油に生活習慣病予防・改善効果のあることは、多くの研究によって周知の事実となっている。しかもその作用は、抗肥満作用、インスリン感受性亢進作用、脂肪肝改善作用、学習能向上作用、骨密度増強作用など、非常に多岐にわたる。これほど多岐にわたる魚油の作用の根幹をなす作用機序とは何なのか、未だ解明されていない。

我々は、これまでに、魚油の脂質代謝改善機序には Sterol regulatory receptor 1c(SREBP1c) の関与が強く、糖質代謝改善機序には Preoxisome proliferator receptors(PPARs) の関与が強いことを報告している()。この報告では、糖質代謝における PPARs の作用は、摂取油脂の種類によって異なることも示しており、PPARs 刺激薬と食事中脂質が相互作用する可能性を示唆している。この機序として、脂肪細胞のサイズ変化が一因である可能性がある。脂肪細胞には、PPAR の他に、G-protein-coupled receptors (GPR) のひとつである GPR120 という脂肪酸結合受容体が発現している。魚油に多く含まれる n-3 系脂肪酸はこの受容体に結合し、脂肪の分化を調節していることが知られる()。

また、インクレチン受容体は膵臓、脂肪細胞をはじめ、多くの組織に発現していることが知られているが、膵臓においては PPARs を介してその遺伝子発現が調節されることがいくつかの報告において示されている()。よって、PPARs 刺激作用を有する魚油は、インクレチン分泌を調節するのみならず、各種臓器におけるインクレチン受容体遺伝子発現量も PPARs を介して調節していることが示唆されるが、報告はない。前述した我々の先行研究で示唆された糖質代謝への PPARs の関与は、インクレチン受容体を介した影響であった可能性がある。その上、油脂の種類と PPARs 刺激薬が相互作用する可能性があるのならば、魚油摂取と Dipeptidyl peptidase(DPP)4 阻害薬などのインクレチン作用を増強する薬剤との相互作用も示唆される。

このように、魚油とインクレチンの作用機序には共通点が多く、魚油の作用はインクレチンを介した作用である可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景を受け、本研究では、魚油の作用機序に及ぼすインクレチンの役割について検討を行った。

3. 研究の方法

研究当初は、まず食餌誘発性インスリン抵抗性惹起マウスを用い、短期および長期の油脂摂取において、魚油摂取のインクレチン分泌に及ぼす影響を他の油脂摂取と比較検討し魚油のインクレチン分泌に対する影響を検討した後、インクレチン作用機序に対する PPARs の関与、および魚油摂取と DPP4 阻害薬との相互作用について検討する予定であった。しかし、研究開始年度から研究先(場所)が変更となったことに伴い、動物実験実施が困難となった。そこで、細胞実験を通し、本研究目的の達成を試みることにした。

(1) 下部消化管プライマリー細胞を用い、脂肪酸添加によるインクレチン分泌への影響を検討した。ラット下部消化管細胞(ReproCELL, Rat GLP-1 cells)を 12~16 時間培養した後、脂肪酸を添加し、GLP-1 の測定(GLP-1 Total ELISA 96-well Plate Assay, Millipore)を行った。

(2) DPP4 活性に及ぼす脂肪酸の影響を in vitro で検討した。Human DPP4 にパルミチン酸、リノール酸、DHA、EPA を各種濃度で添加して 30 分後、DPP4 活性を測定した。測定には、DPP4-Glo Protease Assay kit(Promega)を用いた。

(3) 2 型糖尿病および 2 型糖尿病予備軍における身体計測値(BMI、筋肉量、脂肪量など)、血糖コントロール指標(血糖、HbA1c など)、食物摂取状況(食品群別摂取量、栄養素摂取量など)との関連性について検討した。平成 25 年、平成 27 年度の 2 年間に渡り(平成 26 年度は研究中断)、2 型糖尿病および 2 型糖尿病予備軍と診断され、かつ研究に同意の得られた者を対象として、異なる 2 病院で調査を実施した。DPP4 阻害薬および DPP4 阻害活性の報告されているビッグアナイド薬、チアゾリジン薬の服用者は除外した。また、顕性腎症以上に悪化した腎症患者も除外した。1 回目の外来受診時に調査内容に

についての説明と同意書への記入を行い、2 回目の外来受診時に採血、身体計測、食物摂取頻度調査票の受領・確認を実施した。その後、収集したサンプルおよび調査票の解析を行った。

4. 研究成果

(1) GLP-1 分泌細胞である下部消化管プライマリ細胞を用い、脂肪酸添加によるインクレチン分泌への影響を検討しようと試みたが、実験系が上手く立ち上がらず明確な結果を得ることができなかった。そこで、DPP4 がインクレチンを短時間で分解し、インクレチン量を減少させてしまうことに着目し、in vitro 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った(次項の実験)。

(2) DPP4 に各種脂肪酸を添加したところ、パルミチン酸、リノール酸、DHA、EPA の順に DPP4 阻害活性が高値を示し、パルミチン酸以外では濃度依存性が認められた。また、EPA と DPP4 阻害剤を同時添加したところ、相加効果が認められた。これらの結果から、EPA、DHA は高い DPP4 阻害活性を有しており、魚油の作用機序の一因である可能性が示唆された。また、DPP4 阻害剤の効きを EPA によって高められる可能性も示された。

(3) 研究に同意してくれた対象者は、平成 25 年度には男性 11 名、女性 13 名の計 24 名、平成 27 年度には男性 12 名、女性 14 名の計 26 名(今後あと 1 名に同意依頼予定)であり、2 年間で 51 名の対象者に対し、調査を行うことができる予定である。平均年齢は、平成 25 年度調査では男性 65.9(SD12.2)歳、女性 70.1(SD8.1)歳、平成 27 年度調査では男性 68.0(SD 9.6)歳、女性 63.4(SD 12.9)歳であった。

平成 25 年度調査はすべて終了している。平成 27 年度調査は現在、男性 9 名、女性 11 名の調査が終了しており、5 月末で全ての対象者の調査が終了予定である。食物摂取状況は順次解析を進めており現在 13 名分の解析が終了、DPP4 活性については全ての調査が終了した後

に測定する予定である。平成 27 年度調査・解析

が終了した後、すべてのデータに関し、総合的に解析予定である。

調査終了者の平均 HbA1c は、平成 25 年度調査で男性 6.9(SD 0.9) %、女性 6.7(SD 0.5) %、平成 27 年度調査で男性 6.6(SD 0.8) %、女性 6.5(SD 0.8) % であった。調査終了者の身体状況について検討すると、平均 BMI は、平成 25 年度調査で男性 25.0(SD 4.3)、女性 21.7(SD 3.5)、平成 27 年度調査で男性 24.3(SD 3.9)、女性 23.5(SD 5.4) であった。

平成 27 年度調査では、血清 DHA 濃度についても検討しているが、現在、食事調査とともにデータの揃っている 12 名について検討すると、血清 EPA および DHA 濃度と魚介類摂取量との相関は各々 $R=0.504$ ($p=0.095$)、 $R=0.667$ ($p=0.018$) と有意傾向あるいは有意であった(図 1)。このことから、食物摂取状況調査による魚介類摂取量の算出は妥当であることが示唆された。

以上より、in vitro においては魚油に含まれる脂肪酸である EPA、DHA に DPP4 活性阻害効果がみられ、これが魚油の作用機序の一因である可能性が示唆された。このことは、DPP4 阻害剤の効きを EPA によって高められる可能性も示している。糖尿病患者を対象とした研究は現在継続中で、解析結果が得られれば魚油摂取が及ぼす DPP4 活性への影響を検証できると考える。

< 引用文献 >

Wakutsu M, Tsunoda N, Shiba S, Muraki E, Kasano K, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)-independent functions of fish oil on glucose and lipid metabolism in diet-induced obese mice, *Lipids Health Dis*, 9, 2010, 101

DOI: [10.1186/1476-511X-9-101](https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-101)

Miyauchi S, Hirasawa A, Ichimura A, Hara T, Tsujimoto G. New frontiers in gut nutrient sensor research: free fatty acid sensing in the gastrointestinal tract, *J Pharmacol Sci*, 112

(1), 2010, 19-24

DOI:10.1254/jphs.09R09FM

Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ, Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- in mice, *Diabetologia*, 54(2), 2011, 339-49

DOI: 10.1007/s00125-010-1937-z

Gupta D, Peshavaria M, Monga N, Jetton TL, Leahy JL, Physiologic and pharmacologic modulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta-cells by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma signaling: possible mechanism for the GIP resistance in type 2 diabetes, *Diabetes*, 59(6), 2010, 1445-50

DOI:10.2337/db09-1655

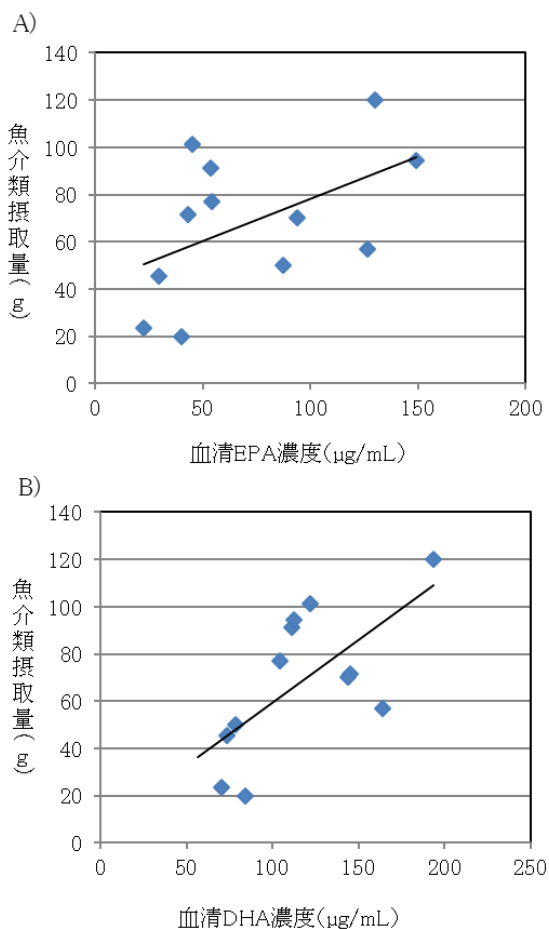


図 1

血清 EPA、DHA 濃度と魚介類摂取量との関連

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Tsunoda N, Inayama T, Hata K, Oka J, Vegetable dishes, dairy products and fruits are key items mediating adequate dietary intake for Japanese adults with spinal cord injury, *Spinal cord*, 査読有, 53(11), 2015, 786-790

DOI:10.1038/sc.2015.78

Tsunoda N, Inayama T, Hata K, Oka J, Key Dietary Behavioral and Environmental Factors Mediating Dietary Variety Among Japanese Adults with Spinal Cord Injury, *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 査読有, 4, 2015, 111-117

DOI: 10.11648/j.ijnfs.20150401.25

Inayama T, Higuchi Y, Tsunoda N, Uchiyama H, Sakuma H, Associations between abdominal visceral fat and surrogate measures of obesity in Japanese men with spinal cord injury, *Spinal Cord*, 査読有, 52(11), 2014, 836-841

DOI:10.1038/sc.2014.162

Sakurai R, Yasunaga M, Saito K, Fukaya T, Kim MJ, Tsunoda N, Muraki E, Suzuki H, Shinkai S, Watanabe S, Fujiwara Y, Effects of a comprehensive intervention program, including hot bathing, on physical function in community-dwelling healthy older adults: a pilot randomized controlled trial, *Aging clinical and experimental research*, 査読有, 25(4), 2013, 453-461

DOI: 10.1007/s40520-013-0080-3

Sakurai R, Fujiwara Y, Saito K, Fukaya T, Kim MJ, Yasunaga M, Kim H, Ogawa K, Tanaka C, Tsunoda N, Muraki E, Suzuki K, Shinkai S, Watanabe S, Effects of a comprehensive intervention program, including hot bathing, on overweight adults: a

randomized controlled trial, *Geriatrics & gerontology international*, 査読有, 13(8), 2013, 638-645

DOI: 10.1111/j.1447-0594.2012.00955.x

稲山貴代, 横瀬道絵, 角田伸代, 内山久子, 佐久間肇, 樋口幸治, 岡純, 加園恵三, 推定方法の違いによる在宅の脊髄損傷者の推定エネルギー必要量についての検討, 栄養学雑誌, 査読有, 71(2), 2013, 59-66

秦希久子, 角田伸代, 稲山貴代, 在宅脊髄損傷者の食生活の包括的特性ならびに性・年齢区分・損傷部位による差異についての検討, 栄養学雑誌, 査読有, 70(6), 2012, 346-361

Muraki E, Chiba H, Taketani K, Hoshino S, Tsuge N, Tsunoda N, Kasono K, Fenugreek with reduced bitterness prevents

diet-induced metabolic disorders in rats, *Lipids Health Dis*, 査読有, 11, 2012, 58

DOI: 10.1186/1476-511X-11-58

〔学会発表〕(計3件)

角田伸代, 秦希久子, 稲山貴代, 独居の男性脊髄損傷者においてソーシャルサポートは良好な食物摂取を導くための重要な要因である, 第62回日本栄養改善学会学術総会, 2015年9月24~26日, 福岡国際会議場, 福岡サンパレスホテル(福岡県福岡市)

金子康彦, 早川恵理香, 角田伸代, 小嶋紀子, 今泉良典, 若松俊孝, 嚥下食料理教室の取り組みと継続に向けた今後の課題の検討, 第16回日本在宅医学会大会, 2014年3月1~2日, グランドホテル浜松(静岡県浜松市)

小嶋紀子, 角田伸代, 早川恵理香, 今泉良典, 若松俊孝, 金子康彦, 細井孝之, 高齢者糖尿病患者における糖尿病ランチタイム教室の継続的参加による療養効果, 第67回国立病院総合医学会, 2013年11月8~9日, 石川県立音楽堂, ホテル日航金沢, ホテル金沢, 金沢市アートホール(石川県金沢

市)

6. 研究組織

(1) 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