

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350131

研究課題名(和文) インスリン抵抗性改善を目的とした食品成分の探索

研究課題名(英文) The search of food component which shows the improvement of insulin resistance

研究代表者

清瀬 千佳子 (Kiyose, Chikako)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：60392528

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)：本研究は、糖尿病発症のメカニズムの一つである「インスリン抵抗性」を改善する食品成分を見出す事を目的として検討を行った。最初にインスリン抵抗性惹起細胞の構築を試みた所、マウス由来筋芽細胞であるC2C12細胞におけるインスリンのシグナル伝達をパルミチン酸添加によって抑制させる事が出来た。そこでこの細胞を用いて食品成分を検討した結果、ビタミンE同族体の一つである  $\delta$ -トコフェロールがインスリン抵抗性を改善する事を見出した。次に、糖尿病誘発マウスに摂取させて検討を行ったが、糖尿病改善効果は見られなかった。今後は同マウスを用いて、糖尿病発症前より  $\delta$ -トコフェロールを摂取させて検討を行いたいと考えている。

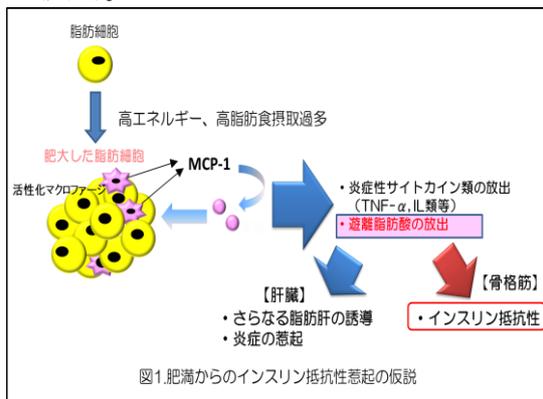
研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the search of food component which improve insulin resistance. First, I tried a construction of insulin resistance cell using C2C12 cells, skeletal muscle cell of mouse. Consequently, I succeeded in the construction of the insulin resistance cell using palmitate. Next, I investigated the effects of vitamin E analogs on the improvement of insulin resistance in these insulin resistance cells. As the results of experiment, I found that  $\delta$ -tocopherol can improve the phosphorylation of Akt in insulin resistance cells. Secondly, I investigated the effects of  $\delta$ -tocopherol on the insulin resistance in KKAY mice, a diabetes model mice. The expressions of IRS-1 and IRS-2 mRNA in liver of H group were significantly lower than those of C group. But, there were no significant differences in the expressions of IRS-1 and IRS-2 mRNA between H group and  $\delta$ -Toc group. Therefore,  $\delta$ -tocopherol could not show an improvement effect of insulin resistance in KKAY mice.

研究分野：食品機能学

キーワード：食品成分 ビタミンE インスリン抵抗性改善 C2C12細胞 KKAYマウス

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、食品成分による生活習慣病改善効果について研究を行っており、特に肥満から引き起こされる非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)と、特にその中の非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に着目し、その改善に向けて様々な検討を行ってきた。NASHは現在、日本で罹患率が急増している疾患で、飲酒しないにも関わらず、アルコール性脂肪性肝炎と同様の病態を示すといわれ、肝硬変、肝がんへの移行率も高く、今後さらに問題となる疾病だと危惧されている。そこで、この疾病に対する改善効果のある食品成分を見出すことを目的として、これまで研究を行ってきた。申請者らは高脂肪食負荷+炎症性サイトカインを投与するモデル動物を作製し、食品成分の1つであるビタミンEの効果について検討を行った結果、モデル動物に予め、ビタミンEの一種であるトコトリエノール類を摂取させておくと、肝臓へのトリアシルグリセロールの蓄積を有意に抑制し、また、炎症誘導(IL-1 $\beta$ 、IL-6)、さらに繊維化(TGF- $\beta$ 1)においても有意に抑制することを報告した<sup>1)</sup>。これらの研究を遂行する中で、NASHを引き起こす原因の一つとして、肥満により肥大した脂肪細胞から遊離脂肪酸が放出され、その遊離脂肪酸が肝臓へのさらなる脂肪蓄積と炎症誘導を起こしている事を示唆した。この遊離脂肪酸が糖尿病発症のきっかけとなる「インスリン抵抗性」を同時に起こすことが推察された。この事が本研究を遂行する上での研究背景となった(図1)。



1) Yachi,R.,Kiyose,C.,et.al.,*J. Clin. Biochem. Nutr.*,**52**,146-153,2013

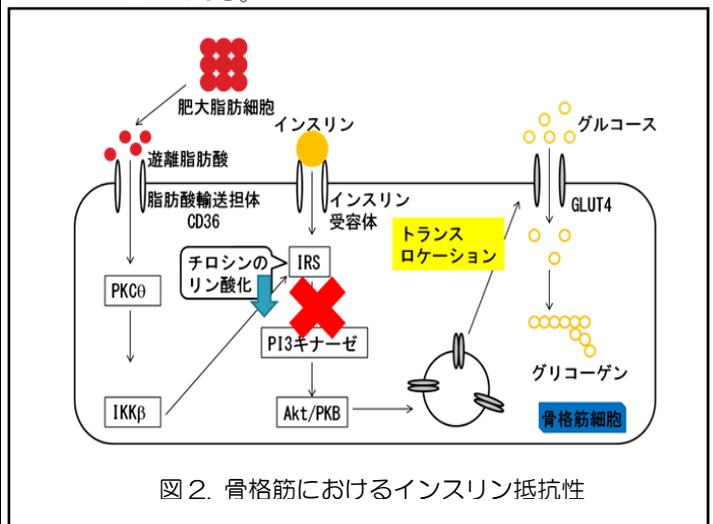
## 2. 研究の目的

遊離脂肪酸、特にステアリン酸やパルミチン酸などの飽和脂肪酸は骨格筋細胞において脂肪酸輸送担体(CD36)によって、細胞内へ取り込まれ、シグナル伝達を介して、IRS のリン酸化を抑制する事で糖の取り込みを阻害するのではないかと推察されている。そこで、このシグナル伝達経路を改善する事が直接的に糖尿病改善に結びつくと考え、この経路を改善する食品成分を見出す事を目的とした。まず、最初に遊離脂肪酸、特にパルミチン酸によるインスリン抵抗性を惹起する脂肪細胞評価系を構築する事にした。さらに、その in vitro の評価系にてスクリーニングを行い、インスリン抵抗性が改善できる可能性が推察された食品成分について、肥満・糖尿病誘発マウスである KKAY を使って in vivo で評価を行いたい。

## 3. 研究の方法

(1) マウス骨格筋細胞であるC2C12細胞を用いたインスリン抵抗性惹起細胞の構築

図2に示すのが、インスリン抵抗性惹起のメカニズムの1つである。



そこで、C2C12細胞にインスリンを添加する事で、IRS 並びに Akt のリン酸化が促進する事を確認した後、遊離脂肪酸であるパルミチン酸を添加して、IRS 並びに Akt のリン酸化が有意に抑制されるような条件を検討した。マウス骨格筋細胞である C2C12 細胞を起こした後、2 回継代する事で分化誘導を行った。分化した細胞を使って、パルミチン酸の添加濃度と培養時間を検討し、最も IRS 並びに Akt のリン酸化が抑制できる点を見出す事にした。

(2) インスリン惹起細胞におけるビタミンE同族体の改善効果について

上記の細胞を構築後に食品成分であるビタミンE同族体についてスクリーニングを行う事にした。ビタミンEは脂溶性ビタミンの一種で、クロマン環にフィチル側鎖が結合した構造をしており、側鎖が飽和型のものをトコフェロール類、不飽和型のものをトコトリエノール類とし、さらにクロマン環のメチル基の位置と数の違いで、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -の4種類がある事から合計8種類天然に存在する。ビタミンEの体内動態の解明により、 $\alpha$ -トコフェロールが最も体内分布・蓄積する事から $\alpha$ -トコフェロールの研究は広く進んでいるが、それ以外の同族体については研究が進んでいなかった。しかし、近年、血管新生抑制、ガン発症抑制など、興味ある報告が発表されるようになった。そこで、本研究では、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコフェロール並びに $\alpha$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコトリエノールについて比較検討を行った。各種ビタミンEは予め、終濃度50 $\mu$ Mずつそれぞれ細胞に添加し24時間培養した後、パルミチン酸を終濃度1mM添加し、さらに24時間培養後、インスリンを終濃度100nM添加し、30分後に細胞を回収し、各タンパク質のリン酸化を検討した。

### (3) KKAYマウスに対する $\delta$ -トコフェロールの抗糖尿病効果

(2)の実験結果より、 $\delta$ -トコフェロールに抗糖尿病病効果が期待できそうだったので、実験動物を用いた in vivo 実験を行う事にした。7週齢のKKAY雄マウス25匹を1週間予備飼育後、次の4群に群分けした。通常食を摂取させるコントロール群(C)、高脂肪・高シヨ糖食を摂取させる群(H)、高脂肪・高シヨ糖食に $\alpha$ -トコフェロールを餌1kg当たり850mg添加したものを摂取させる群( $\alpha$ -Toc)、そして高脂肪・高シヨ糖食に $\delta$ -トコフェロールを800mg、 $\alpha$ -トコフェロールを50mg添加した群( $\delta$ -Toc)とした。8週間飼育した後、解剖し、各種組織を採取した。

## 4. 研究成果

### (1)インスリン抵抗性惹起細胞の構築とビタミンE同族体の改善効果

マウス骨格筋細胞であるC2C12細胞を培養後、パルミチン酸添加濃度と培養時間について検討した。パルミチン酸の添加濃度を0.5mM、1.0mMで比較し、また培養時間を8時間と24時間で比較したところ、パルミチン酸の終濃度を1.0mM、培養時間を24時間にすると、IRSのリン酸化及びAktのリン酸化が有意に抑制された。そこで、その条件で次の実験を進めることにした、

次に、6種類のビタミンE同族体をそれぞれ添加する事で改善できるかどうか検討した。図3にIRSのリン酸化に対するトコフェロールの効果について示した。その結果、コントロール細胞に対して、インスリンを添加するとそのリン酸化は有意に促進されたが、パルミチン酸を添加する事で、この効果は有意に抑制し、インスリン抵抗性が惹起した事が明らかとなった。パルミチン酸を添加する前に、それぞれのトコフェロールを添加してもインスリン抵抗性を改善する事が出来なかった。

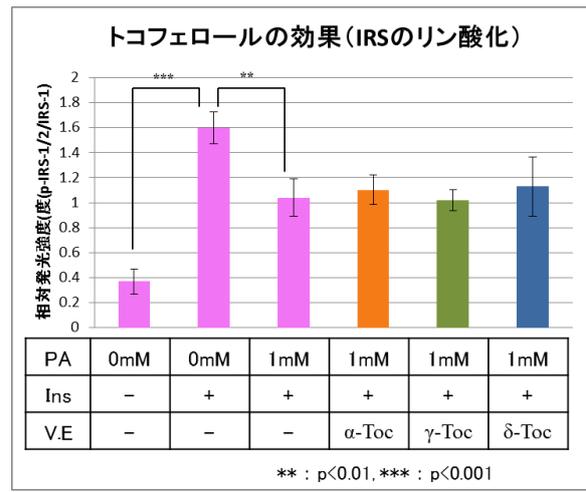


図3. IRSのリン酸化に対するトコフェロール類の効果

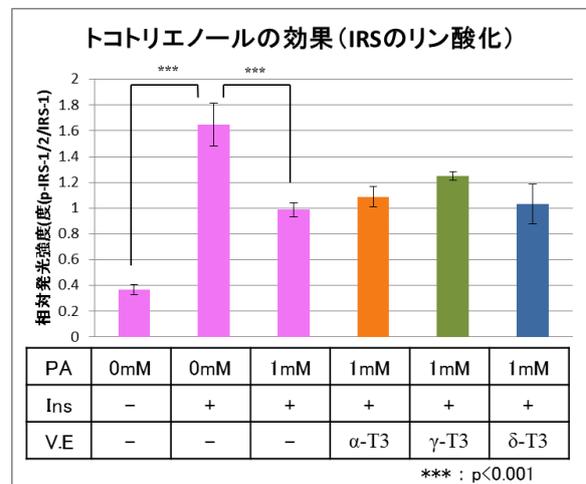


図4. IRSのリン酸化に対するトコトリエノール類の効果

一方、Aktのリン酸化についてはトコトリエノール類については、IRSと同様に改善は見られなかったが(図5)、トコフェロールに関しては、 $\delta$ -トコフェロールでAktのリン酸化を有意に促進したことから、 $\delta$ -トコフェロールにはインスリン抵抗性を改善する効果がある事が示唆された(図6)。

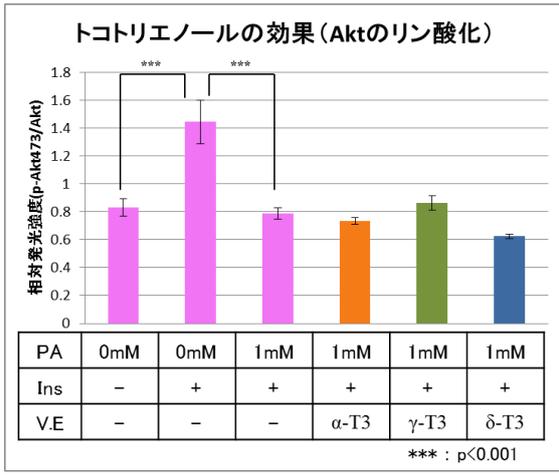


図 5. Akt のリン酸化に対するトコトリエノール類の効果

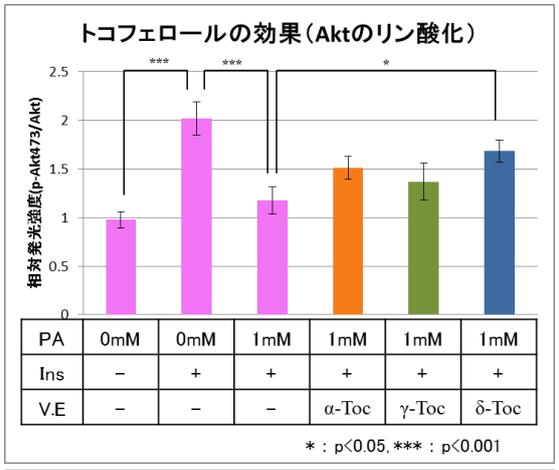


図 6. Akt のリン酸化に対するトコフェロール類の効果

(2) KKAY マウスに対する  $\delta$ -トコフェロールの抗糖尿病効果

図 7 に血中グルコース濃度に対する  $\delta$ -トコフェロールの効果について示した。その結果、C 群に比べて H 群で血中グルコース濃度が有意に上昇した事から、高脂肪・高ショ糖食負荷により糖尿病がより進行した事が示唆された。 $\alpha$ -トコフェロール、 $\delta$ -トコフェロールを同時に摂取させた所、 $\delta$ -トコフェロールで低い傾向が見られたものの有意な差は見られなかった。また、血中インスリン濃度についても同様で、C群に比べて、H 群では有意に高値を示したものの、ビタミンEでの改善効果は見られなかった(図 8)。インスリン抵抗性改善という観点から、肝臓中の IRS-1 並びに IRS-2 の mRNA 発現量についても検討した所、IRS-1 並びに IRS-2 とも高脂肪・高ショ糖食負荷により、有意に抑制されていた事から、インスリン抵抗性が惹起していた事が明らかとなった。しかし、ビタミンEを摂取させても改善するこ

とが出来なかった(図 9,10)。

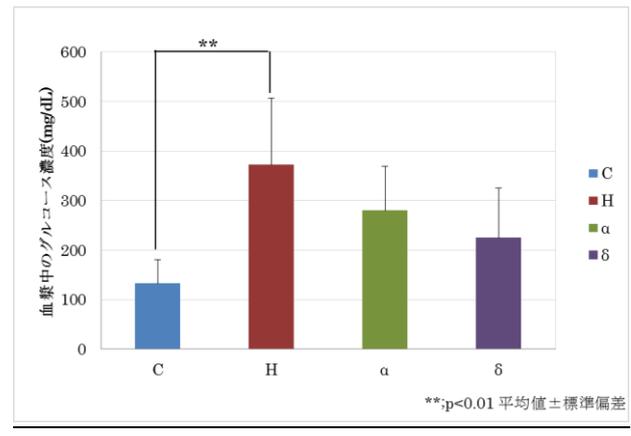


図 7. KKAY マウスの血中グルコース濃度

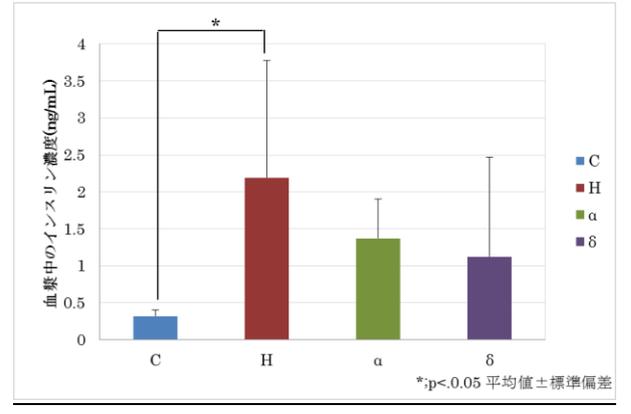


図 8. KKAY マウスの血中インスリン濃度

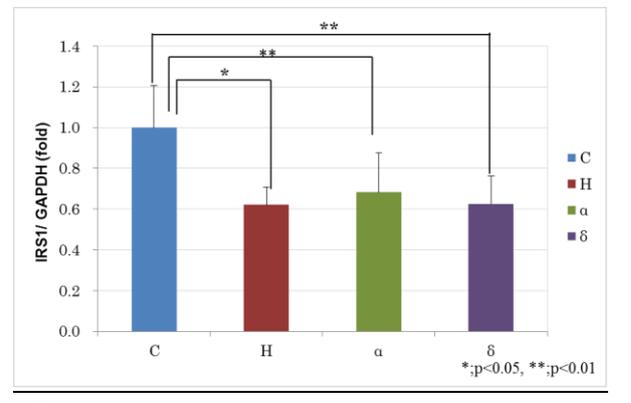


図 9. KKAY マウス肝臓の IRS-1mRNA 発現量

脂肪組織に関しては、ホルマリン固定後、パラフィン包埋をし、マイクロームにて切片を作成し、H&E 染色にて染色した所、図 11 に示すように、H 群に比べて、 $\delta$  群で炎症誘導が抑制されている可能性が推察された。しかし、病理組織学的検査に関しては、個体差も大きい事から、再度詳細な検討が必要だと思われる。

以上の結果より、KKAY マウスにおけるビタミンE同族体の抗糖尿病効果については期待できる結果が得られなかった。この原因の一つに

KKAy マウスの週齢が考えられる。

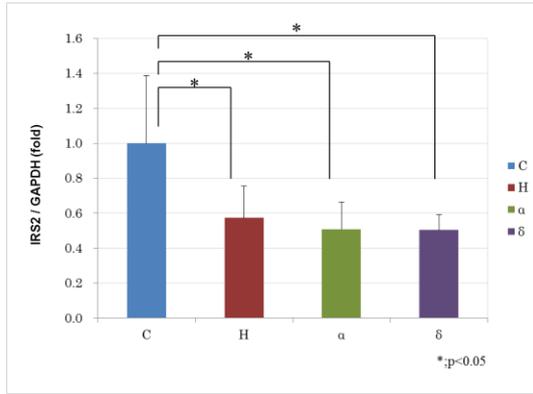


図 10. KKAY マウス肝臓の IRS-2mRNA 発現量

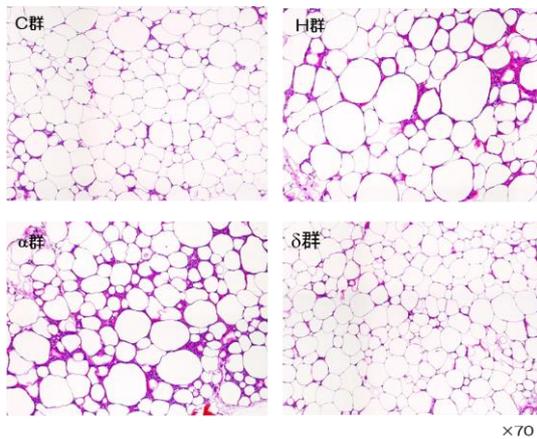


図 11. KKAY マウス脂肪組織の病理組織学的検査

KKAY マウスは 7 週齢より糖尿病を発症するという特徴がある。今回、7 週齢のマウスを用いて実験を開始したために、ビタミンEの効果が出にくかった可能性を推察した。細胞実験の結果からは、 $\delta$ -トコフェロールに糖尿病を抑える可能性が十分考えられるので、今後は、離乳直後の3週齢から実験を開始する事で $\delta$ -トコフェロールが糖尿病発症を遅延できるかどうかに関心をあてて検討をしたいと考えている。

##### 5. 主な発表論文等(ポスター発表1件)

清瀬千佳子、高橋知衣、丸山実里、菊地菜那、永瀬摩奈、田中理恵子: ビタミン E 同族体の抗糖尿病効果、日本油化学会第 55 回年会: 奈良女子大学(H28.9.7-9.9)

##### 6. 研究組織

###### (1) 研究代表者

清瀬 千佳子(KIYOSE CHIHKAKO)  
神奈川工科大学応用バイオ科学部・教授  
研究者番号:60392528