

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460121

研究課題名(和文) 2型糖尿病モデルマウスにおける桑葉摂取による膵細胞機能不全抑制機構の解明

研究課題名(英文) Suppressive mechanism of pancreatic beta cell failure in obese/type 2 diabetes model mice by mulberry leaf intake

研究代表者

亀井 加恵子 (Kamei, Kaeko)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：00214544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、桑葉摂取による耐糖能異常改善効果を膵細胞不全抑制効果と捉え、一時的に膵細胞容積およびインスリン分泌が増加する代償期での膵細胞の増殖促進と、膵細胞が死滅していく不全期での細胞死抑制の両面から解析した。

肥満/2型糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)において、桑葉投与によって膵細胞における小胞体ストレスおよび酸化ストレスが軽減され、不全期での細胞死が抑制されることが明らかになった。一方、桑葉の水抽出物に、培養細胞(マウス由来)に対する細胞増殖促進活性を見出し、桑葉摂取による耐糖能異常改善機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we assumed the improving mechanism of impaired glucose tolerance by mulberry leaf intake from the viewpoint of the suppressive effects on pancreatic beta cell failure. We analyzed the effect of mulberry leaves intake on the proliferation of pancreatic beta cells at the compensation stage, in which pancreatic beta cell volume and insulin secretion temporarily increase, and the effect on the pancreatic beta cell death at the incompensation stage, using obese/type 2 diabetes model mice (db/db mice). We also studied the effect of mulberry leaf extract on cultured beta cells.

In db/db mice, the oral administration of mulberry leaf reduced ER stress and oxidative stress in pancreatic beta cells and suppressed cell death at the incompensation stage. We found cell proliferation promoting activity on cultured beta cells in mulberry leaves extract. Thus, we could clarify a part of glucose tolerance improvement mechanism by mulberry leaf intake.

研究分野：生物化学

キーワード：糖尿病 耐糖能異常 膵細胞 桑葉

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、社会的にも経済的にも大きな問題である。2型糖尿病の発症機構には、インスリン抵抗性と膵β細胞不全の二面性がある。栄養過多状況下では、白色脂肪組織においてマクロファージの浸潤と炎症が惹起され、また分泌されるTNF-αによって全身でのインスリン抵抗性が惹起される。その結果、慢性的な高血糖状態に陥ると、膵β細胞ではプロインスリンから成熟型への変換を担う小胞体において大きな負荷（小胞体ストレス）がかかり、また活性酸素種の産生（酸化ストレス）が増大する。これらのストレスによって、膵β細胞は死滅していき、不可逆的な膵β細胞不全の2型糖尿病へと推移する。

2型糖尿病はインスリン抵抗性が第一義的な原因であるとする考えが支配的であった。しかし糖尿病原因遺伝子や危険因子として同定されたSNPのほとんどがインスリン分泌や膵β細胞の分化に関わる遺伝子である。また、アジア系人種では2型糖尿病発症早期からインスリン分泌能の低下がみられることなどから、インスリン抵抗性ととも膵β細胞機能不全が糖尿病の原因として捉えられるようになってきた。しかし、糖尿病の治療薬は残存している数少ない膵β細胞から強制的にインスリンを分泌させるものが多く、膵β細胞を新生あるいは増加させる根本的な治療へとつながる研究が重要である。

糖尿病治療には、様々な民間伝承的治療法が蓄積しており、生薬である桑 (*Morus alba* L.)もその一つである。桑葉には抗酸化力を持つフラボノイド類やモラシン類などの生理活性物質が多く含まれる。桑葉の経口摂取による血糖降下作用および動脈硬化抑制作用が様々な動物モデルにおいて報告されている。桑葉に含まれるα-グルコシダーゼ阻害物質である1-デオキシノジリマイシンによる糖吸収阻害活性は広く知られており、また、アルカロイドであるファゴミンが膵β細胞に

作用し、インスリン分泌を促進することが報告されている。

我々の研究グループも、桑葉が血管内皮細胞の活性化を抑制し (Shibata Y, *et al.* 2007)、桑葉の経口投与によって高脂血症モデルマウスの動脈硬化病変が抑制されること (Harauma A, *et al.* 2007)を明らかにした。また、肥満/2型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の代謝異常を改善し、肥満脂肪組織の慢性炎症の軽減や抗酸化作用を示すことを報告した (Sugimoto M, *et al.* 2009)。さらに、db/db マウスを用いた糖代謝試験において、桑葉の経口投与による耐糖能異常の改善効果とインスリン分泌能の保持効果を明らかにした。これらの成果を受け、桑葉経口投与による耐糖能異常改善効果をインスリン産生細胞である膵β細胞への効果の面から解析する本研究を実施した。

2. 研究の目的

2型糖尿病の進展では、過食などで高まるインスリン需要に対し、一時的に膵β細胞容積およびインスリン分泌が増加する（代償期）。その後、インスリンの過剰分泌が慢性的となると、膵β細胞が死滅していく（不全期）。我々は、db/db マウスへの桑葉投与によって、代償期（10～15週齢）における膵β細胞の増殖が促進されていることを見いだした。さらに、桑葉投与群では、不全期に向かう15～20週齢にかけての膵β細胞の減少が抑制されていた。これらの結果を受けて、本研究では2型糖尿病の新規治療方略に結びつけるため、桑葉摂取による膵β細胞不全抑制機構の全容を、代償期における膵β細胞の増殖促進と、不全期における細胞死抑制の両面から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 7週齢のdb/db マウスを桑葉投与群および非投与群に分け、桑葉投与群には通常飼料に

5% w/w となるように桑葉乾燥粉末 (*Morus alba*)を添加した飼料、非投与群には通常飼料を自由摂取させ、10 週齢、15 週齢、20 週齢まで飼育した。各週齢において腹腔内糖負荷試験、血中インスリン量測定の後、膵臓を回収した。

(2) 代償期における桑葉による膵 β 細胞の増殖促進機構の解析：桑葉投与による db/db マウスの膵 β 細胞の増殖促進効果を、細胞増殖マーカー PCNA および PDX-1(pancreatic duodenal homeobox gene-1)の免疫染色によって確認した。

代償期の 2 型糖尿病モデルマウスにおける桑葉投与による膵 β 細胞増殖の促進効果が、代謝ネットワーク（臓器間の相互作用）への効果による可能性を検討するため、肝臓における β トロフィンの発現量を定量的 RT-PCR によって解析した。

桑葉中の有効成分による細胞増殖活性を評価するため、各種桑葉抽出物を添加した培地中で培養膵 β 細胞(マウス由来)を培養し、細胞数を評価した。また、クロマトグラフィーによって細胞増殖促進活性物質の単離を試みた。

(3) 不全期における桑葉による膵 β 細胞死抑制機構の解析：TUNEL 法によって、桑葉を投与した db/db マウスの膵臓においてアポトーシスが抑制されていることを確認した。

定量的 RT-PCR および組織免疫学的手法によって膵臓における各種小胞体ストレスマーカーや炎症性サイトカインの発現量を解析した。

培養膵 β 細胞（マウス由来）に酸化ストレス誘導剤として過酸化水素あるいは小胞体ストレス誘導剤としてタプシガルギンを添加し、桑葉抽出物の同時添加あるいは桑葉抽出物の事前添加による桑葉抽出物の影響を評価した。

(4) 桑葉投与による糖新生への影響の解析：グルコース-6-ホスファターゼ、ホスホエノー

ルピルビン酸カルボキシキナーゼの発現量を定量的 RT-PCR によって解析した。

4. 研究成果

(1) 腹腔内糖負荷試験、血中インスリン量測定：10 週齢では桑葉非投与群の血中インスリンレベルは桑葉投与群より高かったが、15 週齢では桑葉非投与群の血中インスリンレベルは低下したのに対し、桑葉投与群ではインスリンレベルが 10 週齢時とほぼ同程度で保たれていた。腹腔内糖負荷試験の結果、桑葉投与によって耐糖能が改善されていることが確かめられた。

(2) 代償期における桑葉による膵 β 細胞の増殖促進機構の解析：桑葉を経口投与した db/db マウスの肝臓中の β トロフィンの発現量は、桑葉非投与群と有意差は認められなかった。 β トロフィンは膵 β 細胞増殖促進ホルモンとして知られているが、桑葉経口投与による膵 β 細胞増殖促進は β トロフィンとは異なる機構によることが明らかになった。

培養膵 β 細胞（マウス由来）を用いた検討の結果、桑葉の水抽出物に細胞増殖促進活性が認められた。一方、メタノール抽出物には細胞増殖促進活性が認められなかった。また、桑葉水抽出物のクロマトグラフィーによる分離を試み、膵 β 細胞増殖促進活性物質として可能性のある物質の単離にほぼ成功した。

本研究期間では活性物質の構造解析には至らなかったが、単離方法を確立できたことから、今後同定できる見通しを立てることができた。

(3) 不全期における桑葉による膵 β 細胞死抑制機構の解析：組織免疫学的解析および定量的 RT-PCR の結果、桑葉を投与した db/db マウスの膵臓では、非投与群と比較して Bip、CHOP、C/EBP α 、XBP-1、ATF4 の発現が有意に低下していた。これらは小胞体ストレス関連因子であり、桑葉の経口投与によって小胞体ストレスが軽減していることが明らか

になった。

炎症マーカーである CRP、IL6、IL1 β 、TNF- α の膵臓における mRNA 発現量には、桑葉投与群、非投与群ともに有意差は認められなかった。

培養膵 β 細胞を用いて小胞体ストレスおよび酸化ストレスに対する桑葉抽出物の影響を解析した。その結果、桑葉水抽出物を培地に添加した場合、非添加群よりも有意に小胞体ストレス誘導剤による細胞死が抑制されることを見出した。過酸化水素による酸化ストレス対しては、桑葉のメタノール抽出物を培地に添加した場合に非添加群よりも有意に細胞死が抑制された。なお、桑葉抽出物とストレス誘導剤を同時に添加した場合および桑葉抽出物で事前に処理した後にストレス誘導剤を添加した場合のいずれにおいても、桑葉抽出物によるストレス抑制効果が認められた。以上より、小胞体ストレス抑制効果は桑葉水抽出物、酸化ストレス抑制効果は桑葉メタノール抽出物に認められたことより、両ストレス抑制物質が異なることが明らかになった。

(4) 桑葉投与による糖新生の影響の解析：桑葉投与マウスの膵臓において、有意差は認められなかったが、糖新生関連酵素の遺伝子の発現が抑制傾向にあった。また、肝臓では有意に抑制されていた。

以上より、2型糖尿病モデルマウスにおける桑葉経口投与による耐糖能異常改善機構の解明に繋がる結果を得ることができた。

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 4 件)

1. T. T. Men, T. D. Binh, M. Yamaguchi, N. T. Huy and K. Kamei. Function of Lipid Storage Droplet 1 (Lsd1) in Wing Development of *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17(5), 648; doi:10.3390/ijms17050648

J. Mol. Sci. 2016, 17(5), 648;

doi:10.3390/ijms17050648

2. T. T. Men, D. N. V. Thanh, M. Yamaguchi, T. Suzuki, G. Hattori, M. Ariei, N. T. Huy, and K. Kamei. A *Drosophila* Model for Screening Antiobesity Agents. *BioMed Research International*, Volume 2016 (2016), Article ID 6293163, doi:10.1155/2016/6293163
3. D. N. Tien, M. Kishihata, A. Yoshikawa, A. Hashimoto, H. Sabe, E. Nishi, K. Kamei, H. Arai, T. Kita, T. Kimura, M. Yokode, and N. Ashida. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- κ B under inflammatory conditions. *Scientific Reports*, 2014 May 28, 4:5094. doi: 10.1038/srep05094
4. N. Ashida, M. Kishihata, D. N. Tien, K. Kamei, T. Kimura, and M. Yokode. Aspirin augments the expression of Adenomatous Polyposis Coli protein by suppression of IKK β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014 Apr 4, 446(2):460-464. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.134.

[学会発表] (計 6 件)

1. T. Men Thanh, Duy Binh Tran, 劉冠辰, 山口政光, Tien Huy Nguyen, 亀井加恵子. Function of lipid storage deoplet 1 (Lsd1) in sing development of *Drosophila melanogaster*. 第 89 回日本生化学会大会. 2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸市
2. 柚木英里, 岡田峻明, 南学, 村山敏典, 横出正之, 亀井加恵子. 糖尿病モデルマウスにおける桑葉の経口投与による耐糖能改善機構. 第 88 回日本生化学会大会. 2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸市
3. 江角拓麻, 岡田峻明, 田村友嗣, 南学, 村山敏典, 横出正之, 亀井加恵子. 桑葉抽出物による膵 β 細胞保護効果. 第 88 回日本生化学会大会. 2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸市
4. 劉冠辰, Men T. Tran, Thi M. Dao, 山口政

光、亀井加恵子。ショウジョウバエにおける脂質代謝関連遺伝子の機能。第88回日本生化学会大会。2015年12月1日～4日、神戸市

5. Men T. Tran、山口政光、亀井加恵子。Role of lipid storage droplet-associated gene in Drosophila wing development. 第88回日本生化学会大会。2015年12月1日～4日、神戸市

6. D. N. Tien, M. Kishihata, M. Nishio, K. Kamei, K. Kabashima, Y. Miyachi, T. Kimura, M. Yokode, and N. Ashida. Roles of IKBeta in fibrosis. 第37回日本分子生物学会。2014年11月25日～27日、横浜市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://biomole-func-chem-turtle.jimdo.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 加恵子 (Kaeko Kamei)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号: 00214544

(2) 研究分担者

横出 正之 (Masayuki Yokode)

京都大学・医学(系)研究科・教授

研究者番号: 20252447

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()