

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500005

研究課題名(和文)小腸フルクトース代謝に注目した新規代謝症候群治療法の開発

研究課題名(英文)A new treatment for metabolic syndrome with references to fructose metabolism

研究代表者

飯塚 勝美 (Iizuka, Katsumi)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40431712

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)：フルクトースの過剰摂取は”メタボ”を引き起こすが知られる。グルコース活性化転写因子ChREBPはフルクトース代謝に関与する遺伝子を誘導し、小腸ではフルクトースの取り込みと分解を、肝臓でフルクトースから他の代謝産物への変換を促進することを明らかにした。フルクトース(果糖)は蛋白の糖化能が高く、細胞障害を引き起こす。したがって、フルクトースの毒性から身体を守る上で小腸および肝のChREBP機能が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Excess intake of fructose is reported to cause dysmetabolic syndrome. We studied the role of glucose activated transcription factor, ChREBP, in fructose metabolism. We identified that ChREBP induces genes expression related to fructose metabolism and thereby promotes fructose uptake and its breakdown in intestine and conversion into other metabolites in liver. Fructose (Fruit sugar) has more potent cytotoxicity because of increased advanced glycation end product (AGE) production. This study showed that intestinal and hepatic ChREBP function has an important role in protecting from fructose toxicity.

研究分野：代謝学、栄養学、糖尿病学、内分泌代謝学

キーワード：ChREBP フルクトース 小腸 GLUT5 ケトヘキソキナーゼ 肝臓 ブドウ糖

1. 研究開始当初の背景

(1) はじめに

フルクトースは、蜂蜜や果物に加えて甘味の強い加工食品（清涼飲料水等）に多く含まれる。フルクトースはグルコースに比べ急速に代謝されるため、フルクトースの過剰摂取は代謝症候群（肥満、耐糖能障害、高中性脂肪血症、高尿酸血症）を惹起する原因となる。しかし、フルクトースによる代謝症候群の発症機構は未だ不明な点が多い。フルクトースを経口摂取した場合、腸管内のフルクトース濃度が 25-100 mM になっても、門脈内のフルクトース濃度は 1 mM 程度、末梢血濃度に至っては 0.1 mM 程度である。フルクトースを経口摂取した場合に最も高濃度のフルクトースにさらされるのは小腸であることから、本申請計画では代謝症候群における小腸フルクトース代謝の重要性に注目した。

(2) 着想に至った経緯

我々はグルコース活性化転写因子 Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) の代謝症候群病態における意義を肝、膵β細胞、脂肪組織について明らかにしてきた。ChREBP は肝での脂肪合成、膵β細胞での増殖、脂肪細胞での糖取り込みに関与する。小腸に関して申請者がこれまで明らかにした知見を下記に示す。

① ChREBP の標的遺伝子にフルクトース代謝に関連した遺伝子が含まれる。

② ChREBP ノックアウトマウスはフルクトースが摂餌できない。

③ ChREBP はフルクトースの代謝部位である小腸で高発現である。

①-③の理由により ChREBP は小腸フルクトース代謝において重要な役割を有すると考えられる。さらに複数の糖尿病治療薬は小腸を標的としていることから、ChREBP の機能調節を介している可能性は高い。そこで、本申請では小腸における ChREBP とフル

クトース代謝の機能連関を明らかにし、小腸 ChREBP 機能/フルクトース代謝を標的とした代謝異常症候群治療法の確立を目指した。

2. 研究の目的

(1) 小腸フルクトース代謝調節機構における ChREBP の役割の解明

ChREBP^{-/-}マウスは高ショ糖（ブドウ糖とフルクトースからなる二糖類）食を長期間負荷すると死亡する個体も見られるようになる。これはフルクトース不耐症の病態 (Glut5^{-/-}マウスの表現型) に類似する。フルクトースは腹腔内投与により直接門脈内から肝臓へ到達することから、フルクトースの経口および門脈投与の場合を比較する。さらに ChREBP ノックアウトマウスを使用することで小腸フルクトース代謝における ChREBP の役割を検証した。

(2) 糖尿病治療薬における小腸 ChREBP 機能/フルクトース代謝の関与の検証

αグルコシダーゼ阻害剤（ミグリトール）は小腸からの糖の吸収を阻害する作用が知られていることから、小腸におけるフルクトース代謝関連遺伝子や ChREBP 転写活性を抑制していると予想される。薬剤投与時の ChREBP およびフルクトース代謝遺伝子の発現変化と小腸での単糖類吸収能変化への効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 小腸フルクトース代謝調節機構における ChREBP の役割の解明

① 長期効果の検討

通常食および高脂肪/高コレステロール/高スクロース食を野生型マウスおよび ChREBP^{-/-}マウス（8週齢、オス）に 21 週間投与し、肝臓および小腸（上部、中部、下部）での遺伝子発現を検討した。

② 短期効果の検討

13 週から 15 週齢の野生型(WT)マウスおよび ChREBP^{-/-}マウスに対して、フルクトースを経口投与もしくは経口投与し、経時的な血糖変化（投与開始から 1 時間ごと 4 時間まで）、1 時間後の肝内フルクトース含量、経時的な小腸、肝臓の遺伝子発現変化を検討した。

(2) 糖尿病治療薬における小腸 ChREBP 機能/フルクトース代謝の関与の検証

野生型マウスに対して、8 週から(1)で使用した高脂肪/高コレステロール/高スクロース食にミグリトールを添加した群とミグリトールを添加しない群に分けて 8 週間飼育し、小腸の上部、中部、下部および肝臓における空腹時および自由摂食時の ChREBP 標的遺伝子の発現変化を検討した。次に、通常食および通常食にミグリトールを添加した餌を 8 週から野生型および ChREBP^{-/-}マウス（オス）に摂餌し、16 週で体重変化、小腸の長さ、虫垂の重量を検討した。

4. 研究成果

(1) 小腸フルクトース代謝調節機構における ChREBP の役割の解明

① 長期効果の検討 (Wu W, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2015;461:681-6.)

通常食および高脂肪/高コレステロール/高スクロース食を野生型マウスおよび ChREBP^{-/-}マウス(8 週齢、オス)に 21 週間投与し、肝臓および小腸(上部、中部、下部)での遺伝子発現を検討した。スクロース含有のためか、ChREBP^{-/-}は高脂肪/高コレステロール/高スクロース食の摂食ができずに体重の増加は見られないが、脂肪肝の改善効果は軽度にとどまった単糖類トランスポーター(SGLT1, GLUT2, GLUT5)およびフルクトース代謝酵素(ケトヘキソキナーゼ; KHK)の発現は小腸上部>中部>>下部の順であり、野生型に比べて ChREBP^{-/-}マウスで GLUT2, GLUT5, KHK の発現が低下した(図 1)。SGLT1

については ChREBP との関連は見られなかった。以上から、ChREBP が小腸において GLUT5 および GLUT2, KHK の発現調節を行っていることを示唆する結果であった。

② 短期効果の検討

(Kato T and Iizuka K, et al. 投稿準備中)

次にフルクトースは投与経路によって異なる代謝を受ける点に注目した。経口投与では小腸~門脈~肝臓の順に代謝されるが、腹腔内投与では小腸をバイパスし直接門脈から肝臓に到達する。このような代謝経路の違いを利用し、WT と ChREBP^{-/-}マウスに対してフルクトースの経口投与と腹腔内投与実験を行なった。

フルクトースの経口投与では血糖の上昇は野生型でごく軽度(20mg/dl)見られるのみで、ChREBP^{-/-}マウスでは見られなかった。さらに、肝臓内フルクトース含量(肝臓へ到達したフルクトースを反映)は投与前に比べてほぼ変化が見られなかった。遺伝子発現についても、小腸上部では ChREBP の標的遺伝子の増加が見られ、ChREBP^{-/-}マウスでその変化は消失した。さらに、肝臓における ChREBP の標的遺伝子の増加も見られなかった(図 1)。

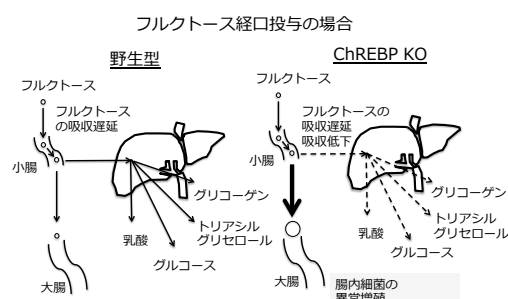


図1 フルクトース経口投与時の野生型と ChREBPノックアウトマウスの相違点

したがって、フルクトース経口投与による ChREBP の活性化は小腸上部のみであり、肝臓での効果は限定的であった。す

なわち、小腸でのフルクトース取り込みにおいて、ChREBP による小腸の GLUT5 および KHK 遺伝子発現調節が重要と考えられた。次に、フルクトースの腹腔内投与により WT および ChREBP^{-/-}マウスの両方で血糖の上昇（200 程度）が見られたが、ChREBP^{-/-}マウスではピークの遅延が見られた。上記に一致して、肝臓内フルクトース含量は WT に比べ ChREBP^{-/-}マウスで高値であった。肝臓での ChREBP 標的遺伝子 (GLUT2, KHK) 発現の増加は WT では見られ、ChREBP^{-/-}マウスでは増加が見られなかった。小腸では ChREBP 標的遺伝子発現 (GLUT5, KHK) の変化はごく軽度であった (図 2)。

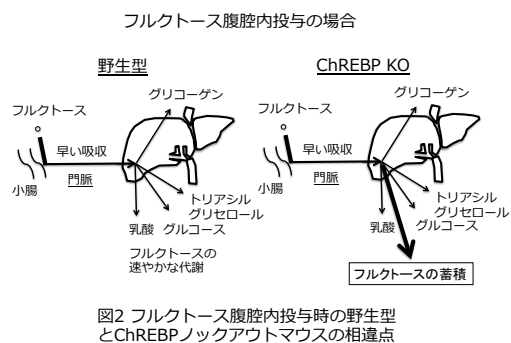


図2 フルクトース腹腔内投与時の野生型とChREBPノックアウトマウスの相違点

したがって、フルクトース腹腔内により、ChREBP の活性化は肝臓で見られ、ChREBP^{-/-}マウスではその変化は消失した。すなわち、肝臓におけるフルクトース代謝では ChREBP により調節される KHK の役割が重要と考えられた。

(2) 糖尿病治療薬における小腸ChREBP機能/フルクトース代謝の関与の検証

(Kato T and Iizuka K, et al. 投稿準備中)

(1) で前述の高スクロース食と α グルコシダーゼ阻害剤であるミグリトールを添加した高スクロース食 (ミグリトール群) をそれぞれ付加し、小腸各所でのフルクトース代謝遺伝子の発現を検討した。ミグリトール

群では、小腸上部からの糖吸収が抑制されるため、小腸上部での ChREBP 標的遺伝子 (GLUT5, KHK, PKLR) の発現は低下し、むしろ小腸下部で同遺伝子の発現が誘導された。すなわち、 α グルコシダーゼ阻害剤では、通常では糖吸収の 90% を担う小腸上部でなく、小腸下部で糖吸収が行われることが示唆された (図 3)。

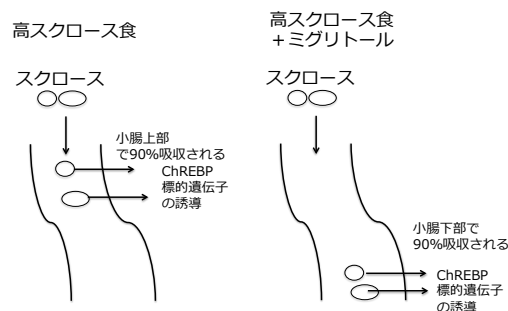


図3 ミグリトール添加により小腸での糖吸収およびChREBP標的遺伝子発現誘導は小腸下部へ移行する。

最後に、ChREBP は高スクロース食を摂餌できないため、通常食にミグリトールを添加した飼料を作成し、ChREBP^{-/-}マウスに負荷したところ、野生型マウスと異なり、摂餌量の低下と体重の著明な減少を認めた。同マウスでは GLUT5^{-/-}マウスで見られるのと同様の虫垂の著明な増加を認めており、腸管内細菌叢の異常増殖があるのではないかと考え、今後検討を加えていく予定である。

(3) 研究の総括

(Iizuka K. *Nutrients*. 2017;9:E181. Iizuka K. *BBA - Molecular Basis of Disease* 2017;1863:474-485.)

以前はフルクトース摂取量と肥満、糖尿病との関連が指摘されたが、最近の疫学ではフルクトース摂取量でなく総カロリー摂取量の増加によるとの解析結果が近年多数を占めている。その根拠として、フルクトースは小腸からの吸収量に限りあげられる。さらに、過剰なフルクトース摂取は消化吸収能が低いことと一致

して、腹部症状（下痢）など過敏性腸症候群を引き起こすことが知られている。本研究結果も上記に一致した結果であり、小腸 ChREBP 機能抑制により、肥満の抑制は期待できるが、腸管の腫大など過敏性腸症候群に似た病態を引き起こす。フルクトースは糖化能がグルコースに比べ10倍高いなどの細胞毒性が見られる。フルクトースの毒性から身体を守る上で小腸および肝臓の ChREBP 機能が重要であることを本研究は明らかにした。フルクトースの過剰摂取をしないことが、肥満や過敏性腸症候群の予防につながると言える。

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)

1. Iizuka K. The Role of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Intestinal and Hepatic Fructose Metabolism. *Nutrients*. 2017;9:E181. doi: 10.3390/nu9020181. 査読有
2. Iizuka K. The transcription factor carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP): a possible link between metabolic disease and cancer. *BBA - Molecular Basis of Disease* 2017;1863:474-485. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.029. 査読有
3. Kato T, Iizuka K, Niwa H, Takeda J. Liraglutide improved glycaemic instability in a diabetic patient with insulin antibody. *BMJ Case Rep*. 2016 Jul 20;2016. pii: bcr2016216028. doi: 10.1136/bcr-2016-216028. 査読有
4. Iizuka K, Kato T, Mizuno M, Takeda J. A discrepancy between plasma glycated albumin and HbA1c levels in a patient with steroid-induced diabetes mellitus. *BMJ Case Rep*. Published online 9 March 2016. pii:bcr2016214788. doi:10.1136/bcr-2016-214788. 査読有
5. Iizuka K, Niwa H, Kato T, Takeda J. Dasatinib improves insulin sensitivity and affects lipid metabolism in a patient with chronic myeloid leukemia. *BMJ Case Rep* 2016:published online 12 February 2016. pii: bcr2015214284. doi:10.1136/bcr-2015-214284. 査読有
6. Iizuka K, Fujisawa T, Takeda J. Concurrent insulinoma and impaired glucose tolerance suspected as owing to obesity. *BMJ Case Rep* 2016:published online 4 January 2016. pii: bcr2015213793. doi:10.1136/bcr-2015-213793. 査読有
7. Wu W, Tsuchida H, Kato T, Niwa H, Horikawa Y, Takeda J, Iizuka K. Fat and carbohydrate in western diet contribute differently to hepatic lipid accumulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015;461:681-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.092. 査読有
8. Iizuka K, Mizuno M, Niwa H, Takeda J. A rare case of variant hemoglobin (Hb Yahata) suspected because of inconsistent plasma

glucose and HbA1c levels. *Intern Med.* 2015;54:1771-5. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4017.
査読 有

[学会発表] (計 11 件)

1. 鷹尾賢、飯塚勝美、加藤丈博、土田宏美、丹羽啓之、堀川幸男、武田純 高脂肪食誘導性肥満病態における脂質と糖質の役割の違い 第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年 5 月 18 日～20 日、愛知県名古屋市
2. 加藤丈博、飯塚勝美、鷹尾賢、土田宏美、丹羽啓之、北村忠弘、堀川幸男、武田純、小腸と肝臓における ChREBP のフルクトース代謝への関与 第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年 5 月 18 日～20 日、愛知県名古屋市
3. 丹羽啓之、飯塚勝美、鷹尾賢、加藤丈博、ウデレフ、土田宏美、堀川幸男、武田純、肝 VLDL 分泌機構に着目した ChREBP と SHP の相互作用についての考察 第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年 5 月 18 日-20 日、愛知県名古屋市
4. 加藤丈博、飯塚勝美、ウウデレフ、土田宏美、丹羽啓之、堀川幸男、北村忠弘、武田純、ミグリトールの脂質代謝への影響に関する検討 高コレステロール食負荷マウスを用いた解析、第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 19 日-21 日、愛知県名古屋市
5. 丹羽啓之、飯塚勝美、ウウデレフ、堀川幸男、武田純、3T3L1 細胞を用いた脂肪細胞における GLP-1 受容体の存在についての検証、第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 19 日-21 日、愛知県名古屋市
6. Katsumi Iizuka, Hiroyuki Niwa,

Takehiro Kato, Hiromi Tsuchida, Yukio Horikawa, Jun Takeda, The role of ChREBP in the development of high fat diet induced fatty liver. American Diabetes Association 75th Scientific Session, 2015 年 6 月 5 日-9 日、米国マサチューセッツ州ボストン

[図書] (計 1 件)

1. 飯塚勝美、ChREBP、疾患モデルの作成と利用 脂質代謝異常と関連疾患 (上巻) 編集委員 尾池雄一 / 佐々木雄彦 / 村上誠 / 矢作直也、LIFE SCIENCE INFORMATION CENTER, 2015 年、p117-124

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 勝美 (IIZUKA, Katsumi)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40431712

(2) 研究分担者

武田 純 (TAKEDA, Jun)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40270855
堀川 幸男 (HORIKAWA, Yukio)
岐阜大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10323370

(3) 研究協力者

加藤 丈博 (KATO, Takehiro)
鷹尾 賢 (TAKAO, Ken)
丹羽 啓之 (NIWA, Hiroyuki)
ウウデレフ (WU, Wudelehu)