

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11629

研究課題名(和文) 抗酸化作用を介した膵内外分泌から紐解く食品含有1,5-AGの生理機能

研究課題名(英文) Physiological roles of 1,5-anhydroglucitol contained in food as unraveled by pancreatic endocrine and exocrine secretions via antioxidant effects

研究代表者

大内 基司 (Ouchi, Motoshi)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20409155

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)：1,5-アンヒドログルシトール(1,5-AG)は、糖尿病の血糖コントロール指標として用いられる。しかし、体内における1,5-AGの作用そのものについては明らかではない。本研究では膵臓を標的臓器に設定し、1,5-AGの膵内外分泌への影響を主眼に置いて検討した。ラット膵細胞培養細胞株とラット摘出膵を用いたオルガンバス(ex vivo)実験において、1,5-AGによるインスリン分泌誘導の有無を評価し、1,5-AG単独では明らかなインスリン分泌誘導はないことが示された。また、ex vivo実験でアミラーゼとリパーゼ分泌について同時に検討し、1,5-AGによる明らかな影響はないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリンのみならず、膵外分泌系を同時測定できるex vivoの実験系を確立した。これは膵内外分泌の相互連関の視点に、新たな評価方法を提示出来たと考えている。また1,5-AGがインスリン分泌を誘導するかはコントロールであるが、本研究は分泌誘導しない結果であり、一定の方向性を示したものである。膵外分泌や膵病理組織変化に対し、1,5-AG単独で明らかな変化も認めなかった。上記の陰性所見の一部は、1,5-AGが含有された漢方薬にてインスリン分泌誘導をした臨床報告がないことを後押しする。1,5-AGは食品含有されており、栄養学領域を含め学際的研究へ発展する足掛かりとなったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：1,5-Anhydroglucitol (1,5-AG) is a clinical biomarker for glycemic control in patients with diabetes mellitus. However, the physiological roles of 1,5-AG are yet to be understood. In this study, we designed experiments using the pancreas as a target organ and investigated the effects of 1,5-AG on pancreatic endocrine and exocrine secretion. We examined whether 1,5-AG induces insulin secretion using an organ bath and rat insulinoma cell line in rat preparations. Both experimental systems revealed no relationship between induction of insulin secretion and presence of 1,5-AG. In addition, ex vivo experiments showed that amylase and lipase secretion by 1,5-AG had no noticeable effect.

研究分野：薬理学

キーワード：1,5-アンヒドログルシトール オルガンバス実験 インスリン分泌 膵外分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1,5-アンヒドログルシトール (1,5-AG) は大豆をはじめ様々な食物に含まれており、体内の90%が食物から摂取され、10%は肝臓で合成されている [1]。1,5-AG はグルコースと同様に一部が腎臓から排泄され、健康人では血中1,5-AG濃度は一定に維持される。糖尿病患者で血中1,5-AG濃度が低下することは知られており [2]、臨床指標として用いられている。1,5-AG はグルコースと構造が類似しており、グルコースに次いで高い血中濃度を持つ糖類であるが、エネルギーが産生されるという報告はない。

1,5-AG の数少ない基礎的検討では、インスリン分泌刺激作用が報告されている [3]。最近では、1,5-AG が加齢・老化に関わる代謝物の一つではないかと議論もされている [4]。しかし、体内での役割そのものについては明らかではない。生体内の役割解明をすすめる手始めとして、これまでの経緯と基礎医学研究を考慮し、まずは膵臓に着目した。

2. 研究の目的

膵臓を標的臓器とし、「1,5-AG の体内での役割に抗酸化作用がある」という仮説を設定した。本研究は1,5-AGの抗酸化作用を介した「インスリン分泌制御機構への影響」と「膵外分泌に対する影響」を検討するものである。1,5-AGの膵臓に対するアウトプットに (1)内分泌としてインスリン分泌を、(2)外分泌としてアミラーゼ・リパーゼ分泌をそれぞれ検討する。さらに (3)酸化ストレス関連を検討する。

3. 研究の方法

ラットインスリノーマ細胞である細胞株 Ins-1E 細胞と、ラット摘出膵を用いたオルガンバス (ex vivo) 実験において1,5-AGの作用を検討した。

・以下へ示す2つの実験を実施し、解析を行った。

実験1:

膵臓への直接作用を検討するため、インスリン及びアミラーゼ・リパーゼ分泌を同時に評価できる ex vivo 実験系を構築・推進し、オルガンバス実験の環境整備のための生理活性物質の探索とともに、1,5-AG 単独とグルコース誘導性インスリン分泌への1,5-AG 上乗せ効果を検証した。

実験2:

細胞株 Ins-1E 細胞で、1,5-AG 負荷によるインスリン分泌能の変化を解析した。

・酸化度 / 抗酸化力

(1) 水溶液

1,5-AG の酸化度・抗酸化力を確認するため、まず1,5-AG 水溶液中の酸化度を Reactive oxygen metabolites (d-ROMs) テストにて検討し、抗酸化力を Biological antioxidant potential (BAP) テストにて1,5-AG を別評価した。0.1、1、10mM 1,5-AG 水溶液の還元力を抗酸化の指標として測定し、還元力の測定には三価鉄 (Fe^{3+}) イオンを含む試薬を用い、三価鉄 (Fe^{3+}) イオンが二価鉄 (Fe^{2+}) イオンに還元されると溶液の色が変化することを利用して、比色法にて評価した。

(2) 摘出膵

0、0.1、1、10mM 1,5-AG を tyrode 栄養液に加えラット摘出膵を incubation した。また、その栄養液での酸化ストレス変化を d-ROMs テストにて評価した。

・その他

細胞株 Ins-1E 細胞で1,5-AG 負荷におけるインピーダンス法の xCELLigence を用いた毒性評価、Alamar Blue を用いた cell viability の評価を行った。また膵臓の組織における1,5-AG の影響を評価するために、1,5-AG を含む栄養液でインキュベーションした膵臓について病理的評価を行った。

4. 研究成果

・実験1/実験2 [5-7]:

Ex vivo 実験系の環境改善としてトリプシンインヒビター内トリプシンインヒビター濃度の

確立とインスリンやアミラーゼ・リパーゼの外分泌酵素測定の確認作業を行った。さらに、既知のインスリン分泌誘導物質である sulfonylurea 系薬の glimepiride を用い、ex vivo 実験にてインスリン分泌誘導を確認し、本実験系が対象とする物質のインスリン分泌能を簡便に評価できることも再確認した。

次に、上記の両実験系において高 D-グルコース (400mg/dl) によるインスリン分泌誘導を確認した。Ex vivo 実験にて栄養液内トリプシンインヒビター存在下で通常 (100mg/dl)・高 D-グルコース下での 1,5-AG によるインスリン分泌誘導を検討したところ、1,5-AG の濃度別で明らかな変化がないことが示された。1,5-AG による膵外分泌への影響として摘出膵からのアミラーゼ分泌とリパーゼ分泌を評価したが、インスリン分泌と同様に有意な変化がないことが示された。また、細胞株 Ins-1E 細胞でも通常・高 D-グルコース下での 1,5-AG によるインスリン分泌誘導を検討したところ、ex vivo 実験と同様に 1,5-AG の濃度別で明らかな変化がないことが示された。

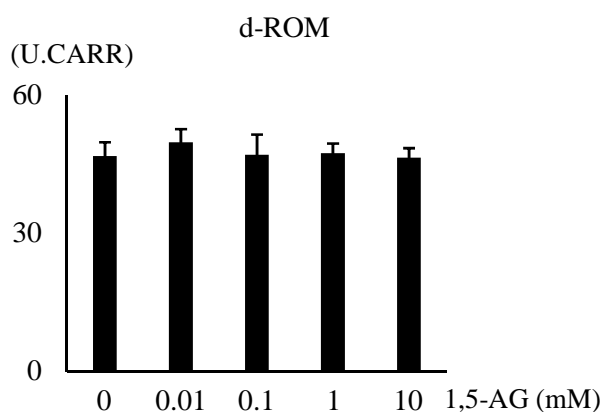
・酸化度 / 抗酸化力

(1) 水溶液

1,5-AG 水溶液の酸化度測定は d-ROMs テストでは、評価可能な数値を得られなかった。一方 BAP テストでは、評価可能な数値を得られたものの水溶液中 1,5-AG 濃度に依存的な変化が見られなかった。以上より、本実験では 1,5-AG 水溶液に明らかな抗酸化力を認めなかった。

(2) 摘出膵

まず栄養液 37 で長時間 incubation による摘出膵の観察では、独特な臭いと形状の変化が見られた。本実験に用いたのは摘出膵であり、膵臓は強力な蛋白質分解酵素を有するため、自己融解をしていると考えられた。次に観察温度を下げ incubation の時間は維持するように設定した。低値ではあるものの d-ROMs 値が得られ、右図の結果となった (U.CARR, average \pm SD)。本実験では濃度依存的な 1,5-AG による変化は見られなかった。



・その他

細胞株 Ins-1E 細胞で 1,5-AG 負荷による明らかな毒性や cell viability の変化は認めなかった [7]。1,5-AG を含む栄養液でインキュベーションしたラット膵臓をパラフィン包埋し、HE 染色標本作製し評価したが、同様に 1,5-AG の有無では明らかな変化を認めなかった。本検討においては、明らかな細胞毒性は見られなかった。

参考文献

- [1]. Yamanouchi T, Tachibana Y, Akanuma H, Minoda S, Shinohara T, Moromizato H, Miyashita H, Akaoka I. Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am J Physiol.* 1992. 263(2 Pt 1): E268-73.
- [2]. Akanuma H, Ogawa K, Lee Y, Akanuma Y. Reduced levels of plasma 1,5-anhydroglucitol in diabetic patients. *J Biochem.* 1981. 90(1): 157-62.
- [3]. Yamanouchi T, Inoue T, Ichiyanagi K, Sakai T, Ogata N. 1,5-Anhydroglucitol stimulates insulin release in insulinoma cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2003. 1623(2-3): 82-7.
- [4]. Chaleckis R, Murakami I, Takada J, Kondoh H, Yanagida M. Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016. 113(16): 4252-9.
- [5]. Morita A, Ouchi M, Satoh K, Terada M, Kon H, Wakashin H, Hayashi K, Anzai N, Oba K, Shimizu A, Fujita T. Development of an organ bath technique for isolated rat pancreas preparations to assess the effect of 1,5-AG on insulin secretion. *Exp Anim.* 2020. 69(2): 127-34.
- [6]. Morita A, Ouchi M, Satoh K, Kobayashi S, Terada M, Wakashin H, Kon H, Hayashi K, Anzai N, Shimizu A, Sugihara H, Oba K, Fujita T. The effects of trypsin inhibitor on insulin secretion using rat pancreas in an organ bath. *In Vivo.* 2021. 35(5): 2551-8.
- [7]. Ouchi M, Morita A, Satoh K, Kobayashi S, Terada M, Kon H, Hayashi K, Suzuki T, Oba K, Sugihara H, Yasutake M, Anzai N, Fujita T. Effects of 1,5-anhydro-D-glucitol on insulin secretion both in in vitro and ex vivo pancreatic preparations. *J Pharmacol Sci.* 2022. 149(2): 66-72.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morita Asuka, Ouchi Motoshi, Satoh Keitaro, Kobayashi Shunsuke, Terada Misao, Wakashin Hidefumi, Kon Hiroe, Hayashi Keitaro, Anzai Naohiko, Shimizu Akira, Sugihara Hitoshi, Oba Kentaro, Fujita Tomoe	4. 巻 35
2. 論文標題 The effects of trypsin inhibitor on insulin secretion using rat pancreas in an organ bath	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2551 ~ 2558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12537	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ouchi Motoshi, Morita Asuka, Satoh Keitaro, Kobayashi Shunsuke, Terada Misao, Kon Hiroe, Hayashi Keitaro, Suzuki Tatsuya, Oba Kenzo, Sugihara Hitoshi, Yasutake Masahiro, Anzai Naohiko, Fujita Tomoe	4. 巻 149
2. 論文標題 Effects of 1,5-anhydro-D-glucitol on insulin secretion both in in vitro and ex vivo pancreatic preparations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 66 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田 亜州華、大内 基司、小林 俊介、佐藤 慶太郎、本間 知夫、小林 未果、鈴木 達也、大庭 建三、安武 正弘、安西 尚彦、藤田 朋恵
2. 発表標題 1,5-アンヒドログルシトールの糖代謝における役割解明
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大内基司、安西尚彦
2. 発表標題 糖代謝と食事性 1,5-アンヒドログルシトール
3. 学会等名 第53回 日本消化吸収学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 亜州華、大内基司、寺田節、鈴木達也、大庭建三、安武正弘、安西尚彦、藤田朋恵
2. 発表標題 血中1,5-アンヒドログルシトール高濃度モデルの糖代謝指標の変化
3. 学会等名 第53回 日本消化吸収学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motoshi Ouchi, Asuka Morita, Keitaro Satoh, Naohiko Anzai, Tomoe Fujita
2. 発表標題 Evaluation of insulin secretion by organ bath of isolated pancreases.
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Morita Asuka, Ouchi Motoshi, Satoh Keitaro, Kobayashi Shunsuke, Anzai Naohiko, Shimizu Akira, Sugihara Hitoshi, Oba Kenzo, Fujita Tomoe
2. 発表標題 Effects of trypsin inhibition on endocrine function in isolated rat pancreas
3. 学会等名 Experimental Biology (EB) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 亜州華、大内 基司、寺田 節、大庭 建三、藤田 朋恵
2. 発表標題 1,5-アンヒドログルシトールの7日間持続投与とマウスにおける血糖変化
3. 学会等名 第43回 日本栄養アセスメント研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田亜州華、大内基司、佐藤慶太郎、小林俊介、安西尚彦、大庭建三、杉原仁、清水章、藤田朋恵
2. 発表標題 ラット摘出膵を用いた簡易インスリン分泌評価実験系の有効性検討と至適化
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内基司、森田亜州華、佐藤慶太郎、小林俊介、清水章、安西尚彦、杉原仁、大庭建三、藤田朋恵
2. 発表標題 ラット膵インスリン分泌評価におけるex vivo実験系の応用 1,5-AGの効果を検証する先行研究
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田亜州華、大内基司、佐藤慶太郎、藤田朋恵
2. 発表標題 ラット摘出膵臓の内外分泌能におけるトリプシン活性阻害の影響
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田亜州華、大内基司、寺田節、大庭建三、藤田朋恵
2. 発表標題 浸透圧ポンプによる血中1,5-アンヒドログルシトール高濃度モデルマウスの作成
3. 学会等名 第27回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	佐藤 慶太郎 (Sato Keitaro) (10549041)	明海大学・歯学部・准教授 (32404)	
研究分担者	森田 亜州華 (Morita Asuka) (30780902)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究分担者	安西 尚彦 (Anzai Naohiko) (70276054)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	本間 知夫 (Homma Tomoo) (80242246)	前橋工科大学・工学部・教授 (22303)	

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
---------	---------