

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：33402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16204

研究課題名(和文) 異所性脂肪組織に起因する糖尿病発症機構の解明と食事因子による改善

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism of Diabetes mellitus attributed to ectopic fat and its suppressive effect with food ingredients

研究代表者

針谷 夏代(Hariya, Natsuyo)

山梨学院大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号：80732784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では食餌負荷によるインスリン抵抗性の各病態において、食品成分およびエピジェネティクス因子が病態改善に及ぼす影響を検討した。高脂肪食においてβ-カロテンの負荷は病態の増悪をまねく可能性が示唆された。水溶性食物繊維ペクチンは飼料の含量および耐糖能の程度により効果が変化することが明らかとなった。エピジェネティクス因子BRD4の抑制は高フルクトース食の影響を抑制したが、過度のBRD4の抑制は病態を悪化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of food ingredients and epigenetic factors on pathological condition improvement in each condition of diet induced insulin resistance. It is suggested that β-carotene may lead to exacerbation of the disease state. It turned out that the effect of water-soluble dietary fiber pectin improvement depending on the content of pectin in the diet and the degree of glucose tolerance in type 2 diabetes rats. Inhibition of epigenetic factor BRD4 suppressed the effect of high fructose diet, however pathological condition could be exacerbated by excessive suppression of BRD4.

研究分野：食生活学

キーワード：インスリン抵抗性 食物繊維 カロテノイド 異所性脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)日本人の主要な死因である癌、心疾患、脳血管疾患の基礎病態の1つには生活習慣病が存在する。生活習慣病の発症には遺伝素因と環境因子の両方が関わっているが、環境因子に含まれる食事・運動・休養・喫煙・飲酒といった生活習慣の影響が大きい。これらは、自己の行動の権限を持つ成人であれば望ましい生活習慣を日々積み重ねることにより疾病を予防できると考えられるが、ライフステージが上がるにつれ家庭における役割や社会的立場が上がるなどの影響により、外食や飲酒機会の増加、睡眠不足、身体活動の減少など生活習慣が乱れやすくなる。20歳以上の成人において、糖尿病が強く疑われる者および糖尿病の可能性を否定できない者の割合は24.2%であり上昇傾向にある。糖尿病は病因により1型、2型、妊娠糖尿病、その他に分けることができ、我が国では95%以上を2型が占める。インスリン抵抗性の発症および膵臓からのインスリン分泌量の低下により慢性的な高血糖を呈する。しかしながら発症の10~15年前からインスリン感受性が低下することが知られており、代償的な高インスリン血症によって膵臓が疲弊するまでは正常血糖が保たれる。

(2)インスリン抵抗性の発症は肥大化した内臓脂肪組織から分泌されるTNFやレジスチンなどの悪玉アディポカインによる惹起が一因とされている。このため内臓脂肪型肥満がメタボリックシンドロームのスクリーニング項目となっている。一方で、欧米と比較して日本人は顕著な肥満でなくともインスリン抵抗性および2型糖尿病を発症することが知られている。日本人は白人よりも膵臓のインスリン分泌能が劣ることが知られているが、一方でインスリン標的組織のインスリン感受性も低い可能性が考えられる。インスリン標的組織の中でも骨格筋は全身の30%を占め、約1,000kcalのグリコーゲンを蓄積することができる。食後はインスリンを受容した血管内皮細胞が一酸化窒素を産生して血管平滑筋を弛緩させることにより骨格筋組織内の毛細血管が拡張し、血液中のグルコースやインスリンが骨格筋組織内へ移行する。一方で、骨格筋のインスリン感受性の低下には筋細胞のインスリン感受性が低下するよりも前に毛細血管の内皮細胞のインスリン感受性が低下することが知られている。毛細血管周囲に存在する脂肪細胞のインスリン感受性が低下し、そこからレジスチンが分泌されることが一因であることが示唆されている。したがって、骨格筋組織内の血管周囲に存在する脂肪細胞のインスリン感受性を維持・増進することが日本人における2型糖尿病の発症に関わることが示唆される。しかしながら、食習慣や食事因子が血管周囲に存在する脂肪細胞のインスリン感受性を維持・増進するのことは明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1)骨格筋組織内の毛細血管周囲の脂肪細胞の性質が食事因子により変化するかを検証する。

(2)骨格筋組織内の毛細血管周囲の脂肪細胞の性質が、脂肪細胞の分化に関わるエピジェネティクス因子BRD4を抑制することにより変化するかを検証する。

3. 研究の方法

(1)食事因子による骨格筋組織内の毛細血管周囲の脂肪細胞の性質変化の検証

食餌性脂質異常症モデルスナネズミにおける-カロテンの影響

-カロテンは脂溶性の栄養素であり抗酸化能を有するとともに、脂肪細胞の増殖および分化に関わる。

雄性、5週齢のスナネズミを1週間の馴化の後に体重および空腹時血糖が等しくなるよう4群(N=8)に分けた。AIN93M(試料対照食、N)をベースとした脂肪エネルギー比率40%Eの高脂肪飼料(対照食、C)に、-カロテンを低濃度(0.1%)余計に添加した飼料(LC)および高濃度(0.4%)余計に添加した飼料(HC)を用意し、各群に自由摂取させた。試験食開始から11週目に経口グルコース負荷試験を行い、12週後に屠殺し各臓器を得た。

2型糖尿病自然発症モデルOLETFラットにおける水溶性食物繊維ペクチンの影響

水溶性食物繊維であるペクチンは植物細胞の細胞壁の構成成分であり、フルーツジャムなどのゲル化に関与する食品成分である。水溶性食物繊維は消化管内の内容物に粘性を与え、消化管内の移動速度を低下させることで食後高血糖の抑制およびインスリン分泌を抑制することが知られている。また、消化管内の遊離コレステロールや胆汁酸を吸着して便として排泄を促進することで、血清コレステロール値を低下させることが知られている。

雄性、4週齢のOLETFラットを糖尿病発症まで飼育した。空腹時血糖値が顕著に上昇したことを28週齢で確認し、体重および空腹時血糖値が等しくなるよう4群(N=10)に分けた。馴化の後、AIN93Mをベースとした高でんぷん食(対照食)に低メトキシル(LM)ペクチンを3%添加した低ペクチン食(LP)、7%添加した中ペクチン食(MP)、10%添加した高ペクチン食(HP)を各群に自由摂取させた。試験食開始から12週後に屠殺し各臓器を得た。

(2)エピジェネティクス因子BRD4の抑制による骨格筋組織内の毛細血管周囲の脂肪細胞の性質変化の検証

BRD4ヘテロ欠損(BRD4^{+/-})マウスにおける高フルクトース食負荷の影響

エピジェネティクス因子BRD4はアセチル化ヒストンに結合し、転写伸長因子PTEF-bをリクルートすることで標的遺伝子の転写を

促進する。BRD4 は脂肪細胞の分化に関与し、3T3-L1 前駆脂肪細胞においてノックダウンすると分化が抑制されることが明らかになっている。また、BRD4 ヘテロ欠損マウスは脂肪組織の萎縮や骨組織の軟弱化などの表現型であり、BRD4 ホモ欠損マウスは胎性致死の表現型を有する。

C57BL/6 マウスをバックグラウンドに持つ雄性の BRD4 ヘテロ欠損マウスを馴化の後、空腹時血糖値および体重に差がないよう2群に分けた。試験 (BF) 群 (N=6) には AIN93M をベースとし、フルクトースを 54.9% 含む高フルクトース食を、対照群 (N=5) には AIN93M を自由摂取させ、13 週間後に屠殺し各臓器を得た。

BRD4 阻害剤 JQ-1 による高フルクトース食負荷の影響

エピジェネティクス因子 BRD4 の阻害剤 JQ-1 は競合阻害により BRD4 がアセチル化ヒストンへ結合するのを阻害する。JQ-1 を 3T3-L1 前駆脂肪細胞の培地に添加することにより、脂肪細胞への分化が抑制されることが先行研究により明らかである。

C57BL/6 マウスを馴化の後、空腹時血糖値および体重に差がないよう4群に分けた。飼料は AIN93M をベースとしフルクトースを 54.9% 含む高フルクトース食に JQ-1 を低濃度添加した飼料を L 群 (N=8) へ、高濃度添加した飼料を H 群 (N=9) へ、対照群 (F 群、N=8) には高フルクトース、飼料対照群 (C 群、N=8) には AIN93M を自由摂取させた。試験食開始から 13 週間後に屠殺し各臓器を得た。

4. 研究成果

(1) 食事因子による骨格筋組織内の毛細血管周囲の脂肪細胞の性質変化の検証

食餌性脂質異常症モデルスナネズミにおける β -カロテンの影響

高脂肪飼料を摂取した C 群、LC 群、HC 群は N 群と比較して顕著に体重が増加した。また、HC 群は LC 群よりも体重が増加傾向にあった。血糖値は、高脂肪飼料を摂取した C 群、LC 群、HC 群において N 群と比較し、増大傾向にあった。経口グルコース負荷試験では、空腹時血糖は高脂肪飼料を摂取した C 群、LC 群、HC 群は N 群と比較して有意に高かったものの、グルコース負荷後の耐糖能に差は見られなかった。体重 10g あたりの組織重量は、肝臓、腸間膜脂肪組織、副睾丸脂肪組織において、高脂肪飼料を摂取した3つの群は N 群と比較して増大傾向にあったが、顕著に増大したのは肝臓であった。肝臓は高脂肪飼料摂取により外観は白濁し、脂肪肝を発症していた。また、 β -カロテンを添加した LC 群および HC 群では肝臓の色目が β -カロテン濃度依存的に黄色くなっており、飼料から摂取した β -カロテンが蓄積していることが確認された。高脂肪食摂取による肥満が進行すると脂肪肝を発症するが、 β -カロテンの抗酸化能により炎症が抑制された可能性が考えられ

るため、IL-1、IL-18、iNOS、Cox2 の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR にて測定した。高脂肪飼料を摂取した3つの群では、いずれの遺伝子においても β -カロテン濃度依存的に遺伝子発現が増大した。一方で、活性酸素種除去酵素の Mn-Sod および Gpx4 遺伝子も β -カロテン依存的に発現が増大した。さらに、ウエスタンブロッティング法により IL-18 たんぱく質および細胞外マトリックス再構成に関与する MMP-9 たんぱく質の発現量も β -カロテン濃度依存的に増大が見られた。類洞におけるコラーゲン線維においても β -カロテン濃度依存的に産生増大が見られた (図1)。

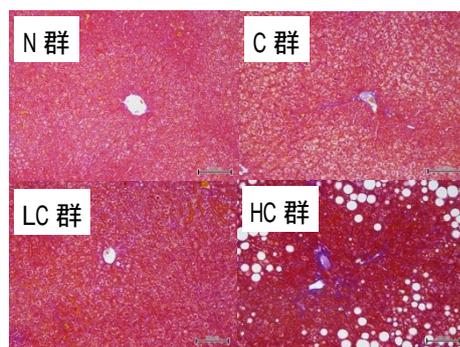


図1 スナネズミの肝臓組織 (アザン染色)

プロビタミン A である β -カロテンは肝臓の星細胞内の脂肪滴に貯蔵される。星細胞は実質細胞と類洞の間に存在し、肝臓において炎症惹起などの刺激により形質が変化し、コラーゲン線維を産生して肝臓の線維化に関与する。肝臓においては脂肪滴の蓄積も β -カロテン濃度依存的に顕著であることから、高脂肪飼料において β -カロテンの付加摂取は、脂肪肝を悪化させる可能性が示唆された。正常な細胞においては少量の活性酸素種は細胞内シグナルの伝達物質であるが、抗酸化能を有する β -カロテンを多量に摂取すると細胞内の活性酸素種の除去が進みすぎること悪影響が出たものと考えられる。

2 型糖尿病自然発症モデル OLETF ラットにおける水溶性食物繊維ペクチンの影響

ペクチンを含む飼料は消化管内で水を含み、飼料に含まれるカルシウムと反応してゲル化すると考えられる。pH7.0 (唾液) および pH2.0 (胃) の水溶液で飼料を混合するとペクチン含量依存的に粘度が増大した。

これを踏まえ、ペクチンを含むでんぷん液を用いて経口でんぷん負荷試験を行ったところペクチン濃度が高いほど最大血糖値が低下した。また、この最大血糖値の抑制効果は、耐糖能に依存した。このことから、ペクチンは耐糖能依存的に食後高血糖を抑制する可能性が示唆された。

ペクチン含有飼料を 12 週間与えた OLETF ラットは、この飼料を与え始めた 37 週齢と比較し、屠殺時の血糖値の上昇幅が抑制された。

このことから、ペクチン含量依存的に2型糖尿病の進行が抑制されたと考えられる。さらに、血清総胆汁酸濃度は飼料のペクチン含量依存的に低下した。しかしながら血清総コレステロール濃度にはペクチンの影響は見られなかった。これらのことから、ペクチンは消化管内の胆汁酸を吸着して便として排泄を促したと考えられるが、肝臓におけるコレステロール合成の亢進は抑制できなかつたと考えられる。肝臓の外観は飼料のペクチン含量依存的に脂肪肝を抑制できたと考えられるため、今後は肝臓脂質濃度を測定し、肝臓への影響を明らかにしたい。骨格筋においては血管周囲の結合組織に存在する異所性脂肪細胞が、LP群で最も観察された。飼料ペクチン含量依存的にこの異所性脂肪細胞の観察される個体数は減少した。この脂肪細胞の肥大化は群間に顕著な差は見られなかった。骨格筋におけるインスリン感受性とペクチンとの関連は今後の検討課題である。

(2) エピジェネティクス因子 BRD4 の抑制による骨格筋組織内の毛細血管周囲の脂肪細胞の性質変化の検証

BRD4ヘテロ欠損(BRD4^{+/-})マウスにおける高フルクトース食負荷の影響

BRD4^{+/-}マウスの成長は群間に差が見られなかったが耐糖能に差が見られ、経口グルコース負荷試験では、BF群は対照群と比較して血糖ピークが15分後へシフトし、負荷2時間値の低下が抑制された。また、経口グルコース負荷試験時の血清中性脂肪濃度もBF群は対照群と比較して低濃度で推移した(図2)。これらのことからBRD4活性を低下させると糖負荷によるインスリン感受性が低下するが、高フルクトース飼料を与えることによりインスリン感受性が増大する可能性が示唆された。

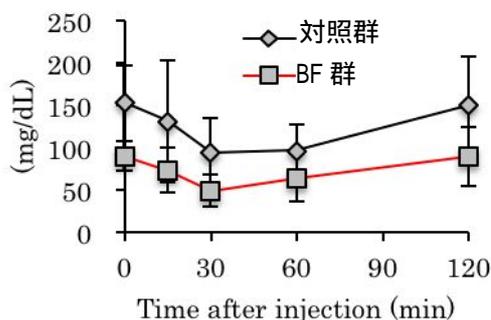


図2 経口グルコース負荷試験における血清中性脂肪濃度の推移

一方で肝臓や脂肪組織などの重量や血清脂質に顕著な差は見られなかった。骨格筋においては筋組織内の毛細血管周囲に異所性脂肪細胞がほとんど観察されなかった。BRD4は脂肪細胞の分化に関与することから、BRD4活性の低下したヘテロ欠損マウスにおいては高フルクトース食の負荷に対し異所性脂肪

細胞の増加を抑制したものと考えられる。

BRD4 阻害剤 JQ-1 による高フルクトース食負荷の影響

高フルクトース食による体重増加はBRD4阻害剤JQ-1の投与により抑制傾向にあった。しかしながらH群では抑制効果が見られなかった。高フルクトース食により上昇した血糖値はL群では抑制されたが、H群では抑制されなかった。これらの結果により、JQ-1によるBRD4の抑制は肥満および高血糖を抑制できるが、BRD4の抑制が過度であると肥満および耐糖能が悪化する可能性が示唆された。肝臓、脂肪組織、腎臓などの臓器重量はL群とH群の間に有意な差は見られなかったが、H群が低い傾向にあった。骨格筋組織内の毛細血管周囲の異所性脂肪細胞は、高フルクトース食の摂取により細胞数および細胞サイズが増大した。JQ-1の投与は濃度依存的にこの異所性脂肪細胞数を減少させた。これらから、BRD4の過度な抑制により骨格筋内の異所性脂肪細胞の発生および肥大化を抑制できたが、他の組織の成長が抑制され、とその影響が出てインスリン感受性の低下として顕在化したものと考えられる。

本研究では消化管や脂肪組織、末梢血白血球など未解析の臓器があるため、今後はこれらの解析を進めエピジェネティクス因子BRD4の影響をより深く探りたい。

(3) 総括

本課題では食餌負荷による各インスリン抵抗性の病態において食品成分およびエピジェネティクス因子が病態改善に及ぼす影響を検討した。高脂肪食において-カロテンの負荷は病態の増悪をまねく可能性が示唆された。水溶性食物繊維ペクチンは飼料の含量および耐糖能の程度により効果が変化することが明らかとなった。エピジェネティクス因子BRD4の抑制は高フルクトース食の影響を抑制したが、過度のBRD4の抑制は病態を悪化させる可能性が示唆された。しかしながら本研究では未解析の臓器も残されており、より詳細な解析による病態変化を検討する必要がある。今後の課題として引き続き本課題の検討を行い、その成果発表してを社会へ還元したい。

<引用文献>

平成28年国民健康・栄養調査結果
N. Hariya et al, Insulin resistance in SHR/NDmc-cp rats correlate with enlarged perivascular adipocytes and endothelial dysfunction in skeletal muscle. JNSV (Tokyo), 60(1): 52-9, 2014

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

近藤真之祐、安田隆史、針谷夏代、望月
和樹、ベータカロテンの過剰摂取は、脂肪肝
を発症したスナネズミにおいて炎症関連タ
ンパク質の発現を増大させる、ConBio2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

針谷 夏代 (HARIYA, Natsuyo)
山梨学院大学・健康栄養学部・准教授
研究者番号：80732784

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 研究協力者

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)