

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00851

研究課題名(和文) 植物乳酸球菌LP28によるメタボリック症候群予防戦略に向けた多角的アプローチ

研究課題名(英文) The polyhedral approach for preventive strategy of metabolic syndrome by plant-derived *Pediococcus pentosaceus* LP28

研究代表者

東川 史子 (Higashikawa, Fumiko)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・特任准教授

研究者番号：70346534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：以前の研究において、当研究グループが龍眼という果物から単離した植物乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28 (以下LP28と略す) が抗肥満作用を有することを見出している。本研究では、LP28が糖代謝に及ぼす影響について検証した結果、食後高血糖を有意に抑制することが、糖尿病モデルマウスを用いた動物実験及び糖尿病境界域の人を対象としたヒト試験において確認された。よって、LP28はメタボリック症候群の因子のうち、肥満と高血糖の二つを改善することから、メタボリック症候群の予防・改善に有益であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の肥満率は男性約30%、女性が約20%、そして糖尿病及びその予備軍は約25%であり、増加の一途をたどっている。メタボリック症候群は、腹部肥満に加え、高血糖・高血圧・脂質異常のいずれか2つ以上を併せ持つ場合、心疾患及び脳血管疾患のリスクが相乗的に高まるという概念であり、危険な状態を意味する。植物乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28の継続摂取は、抗肥満に加え、高血糖をも抑制することが実証された。本研究成果は、今後、LP28を用いた機能性食品の創出を通じて、生活習慣病の予防・改善に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown the anti-obesity effect of *Pediococcus pentosaceus* LP28 (LP28) isolated from longan fruit (*Euphoria longana*), both in animal experiments and clinical trials. In the current study, we investigated the effect of LP28 on the glucose metabolism and found that LP28 reduces postprandial glucose elevation in diabetic model mice, as well as human clinical study in subjects with impaired glucose tolerance (borderline diabetes). Thus, LP28 could be a strategic tool to improve and prevent the metabolic syndrome by reducing obesity and postprandial hyperglycemia.

研究分野：予防医学・分子生物学

キーワード：メタボリック症候群 植物乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* ヒト試験 糖尿 肥満 機能性食品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の資料によると、「糖尿病が強く疑われる人」と「可能性を否定できない人」を合わせた割合は、平成9年から平成24年までに、男性で17.9% 27.3%、女性で15.0% 21.8%と増加し、今や国民の5人に1人が糖尿病もしくはその予備軍である。糖尿病は、網膜症・腎症・神経障害等の重篤な合併症を引き起こし、QOLを著しく低下させる他、脳卒中や虚血性心疾患等の発症・進展を促進することによって、寿命も短くするとされている。糖尿病発症の危険因子としては、家族歴や加齢といった不変のものから、生活習慣(肥満、食事、運動不足)といった本人の努力で改善可能なものが挙げられる。これらの中でも肥満については、BMIが高いほど糖尿病の有病率が高くなる傾向が見られることから、その改善は、糖尿病の予防に直結するものと考えられる。

これまでに当研究グループは、龍眼(ロンガン)という果物から単離した乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28 (以下LP28と略す)を肥満マウスに経口投与すると、体重増加及び脂肪の蓄積が抑制されることを見出した。その際、脂肪肝が著しく改善し、肝臓中の中性脂肪量の有意な低下及び脂肪滴の消失を認めた。また、肥満の人を対象としたヒト試験では、BMI、体脂肪率、腹囲及びLDLコレステロール等が対照群に比べ有意に低下した。これらの結果から、LP28はメタボリック症候群の予防・改善に役立つと期待できるが、さらに、LP28が糖代謝改善作用も有するならば、メタボリック症候群の改善がより強力になるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、既に立証済みのLP28の抗肥満作用に加えて、LP28の糖代謝系への影響の有無、つまり、LP28摂取が糖尿病予備軍に対する発症予防戦略となり得るか否かを評価することを目的として実施した。さらに、抗肥満作用及び糖代謝改善作用に關与するLP28の成分特定とその作用機序の解明を進めた。本研究では、基礎研究はもちろんのこと、ヒト試験の実施により科学的エビデンスを確保し、メタボリックシンドローム改善のための実用的な機能性食品の創出を最終目標としている。本研究を通じて、先進国における重大な問題である肥満及び生活習慣病(メタボリック症候群)の予防に貢献できること、ひいては国民医療費の削減にもつなげることが期待される。

3. 研究の方法

(1)細胞実験

マウス肝由来のHepa1-6細胞株にオレイン酸を添加培養することで脂肪肝化させた細胞、あるいは3T3-L1細胞株を脂肪細胞へと分化させた細胞を実験に用いた。LP28の菌体成分を、細胞質画分と細胞壁画分に分け、前述の培養細胞に添加し、細胞内への脂肪蓄積抑制の有無について検討した。その際、細胞質画分・細胞壁画分にて確認された脂肪蓄積抑制が、LP28特有のものか否かを確認するために、対照として *Lactobacillus plantarum* SN13T (SN13Tと略す) 及び *Lactobacillus plantarum* SN35N (SN35Nと略す)の各画分を用い比較した。

(2)動物実験

6週齢の雄性マウス(B6J及び糖尿モデルマウスdb/db diabetic JAX mouse)を3週間、環境に順応させた後、正常マウス及び糖尿病モデルマウスを、それぞれControl群(B6J Con群及びDb Con群)とLP28摂取群(B6J LP28群及びDb LP28群)に5匹ずつ分け、LP28を食餌中に混合させ、 5×10^9 cfu/day/mouse相当の加熱殺菌菌体を4週間摂取させた。摂取開始から4週後に糖負荷試験(2g glucose/kg体重)及び各種血液生化学検査を行い、LP28摂取の影響を正常マウス及び糖尿病モデルマウス各々で比較した。また、4週後に膵臓を摘出し、インクレチンGLP-1及びGIPの各受容体の発現量をリアルタイムPCRにて定量した。

(3)ヒト試験

75g糖負荷試験(OGTT)2時間値が糖尿病境界域(140mg/dL以上200mg/dL未満)である20~70歳の疾病に罹患していない男女を対象とし、広く一般から募集した。HbA1c 6.5%や高血圧・糖尿病・脂質異常症で治療中の人は除外した。LP28の顆粒を試験食(5×10^{10} cfu相当量/日の加熱殺菌後の菌体)デキストリンの顆粒を対照食とし、条件に適合した研究対象者40名を試験食あるいは対照食に無作為化割り付けを行った。試験食あるいは対照食を1日1回12週間摂取させ、4週ごとに身体測定、血液生化学検査、及び尿検査を行った。主要評価項目は糖負荷試験2時間値の変化量とし、副次的評価項目として空腹時血糖値やインスリン、HbA1c等の変化を評価した。

4. 研究成果

(1)細胞実験

Hepa1-6細胞にオレイン酸を添加培養により増加する細胞内脂肪量が、LP28生菌あるいは死菌を共存させることによって有意に抑制された。次に、LP28を細胞質画分と細胞壁画分に分け、それぞれの画分を培地に添加すると、細胞質画分の添加により細胞内脂肪量は有意に減少した。

一方、LP28 の細胞壁画分を添加したものでは、変化がみられなかった。比較のために用いた SN13T 株及び SN35N 株の細胞質画分及び細胞壁画分の添加では、有意な減少は見られなかったことから、LP28 の細胞質画分に、その関与成分が存在することが示唆された。

また、脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、LP28 の細胞質画分及び細胞壁画分のいずれにおいても有意な脂肪蓄積抑制作用が認められた。このように、肝細胞及び脂肪細胞では結果が若干異なっており、LP28 の抗肥満作用の関与成分が複数存在する可能性が示唆された。

(2)動物実験

本研究で用いた糖尿病モデルマウス (JAX db/db) は 2 型糖尿病を呈する他、顕著に肥満となる。LP28 投与開始時 (9 週齢) 正常マウス (B6J Con 及び B6J LP28) の平均体重は 22.8g であったのに対し、糖尿病マウス (Db Con 及び Db LP28) の平均は 38.3g であった。Db Con 群は B6J Con 群と比較し、体重増加量が有意に高く ($p < 0.05$, Tukey's test) Db LP28 群ではその体重増加が有意に抑制された ($p < 0.005$, Tukey's test)。この時、体重増加量において Db LP28 群と正常マウスの 2 群との有意差は認められず、正常マウスと同程度にまで糖尿病マウスの体重増加が抑えられたことが示された。以前の研究において、LP28 の経口投与は、肥満マウスの体重増加を抑制したものの、正常マウスでは低下しなかった。今回の実験においても、B6J LP28 群の体重増加は抑制しておらず、以前の結果と一致する。また、以前の研究では、高脂肪食で誘発した肥満マウスを用いた実験系で LP28 が抗肥満作用を示したが、本研究の糖尿病モデルマウスにおいても肥満抑制作用を示したことは非常に興味深い。以前の肥満マウス実験では、餌の摂取量は変化せずに体重増加が抑制されていたが、本実験の糖尿病モデルマウスでは、Db Con 群と比較し、Db LP28 群では餌の摂取量が有意に低下していた。しかしながら、B6J LP28 群では餌の摂取量はむしろわずかに増加しており、LP28 の味などの要因による摂取量減少ではなく、食欲抑制が生じた結果である可能性がある。

LP28 投与開始から 4 週後に糖負荷試験を実施した。糖負荷 2 時間後の血糖値の上昇度 (ベースラインからの変化量) の差異を図 1 に示した。糖負荷により、糖尿病マウスのコントロール群 (Db Con) では、著しい血糖値上昇 (正常マウスが 62 mg/dL に対し 206 mg/dL) が認められたが、4 週間の LP28 投与によって、血糖上昇は正常マウスレベルにまで有意に低下した ($p = 0.001$, Tukey's test)。

また、糖負荷後の血中グルカゴン濃度は、正常マウスではすべての測定ポイント (0, 30, 60, 120 min) で検出限界以下であったが、Db Con 群で著しく上昇し、それが Db LP28 群では著しく抑制された (図 2, 120 分後までの AUC が有意に低下。 $P < 0.05$)。

糖負荷後のインスリン濃度は、糖尿病マウスで著しく増加し、また、その分泌の遅延 (T_{max} が有意に増加) が認められた (図 3)。インスリン濃度推移の AUC は糖尿病マウスにおいて LP28 摂取による変化は認められなかったが、Db LP28 群では T_{max} が早くなる傾向、つまり正常マウスに近づき、糖負荷後速やかにインスリンが分泌される傾向が認められた。これら、糖負荷後 2 時間値の低下、グルカゴン濃度の低下、インスリン分泌速度亢進のすべての方向性が矛盾な

図1 糖負荷後120分における血糖値上昇度

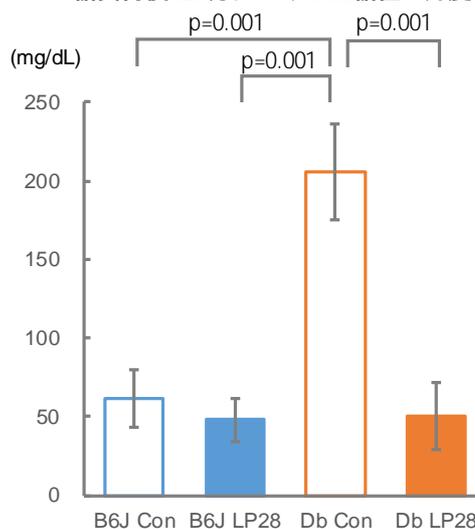


図2 糖負荷後の血中Glucagon濃度推移

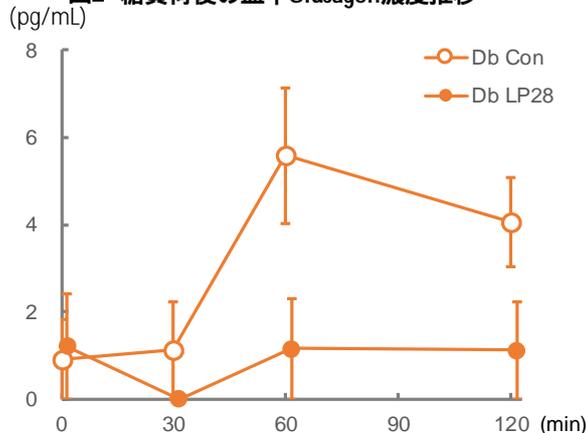
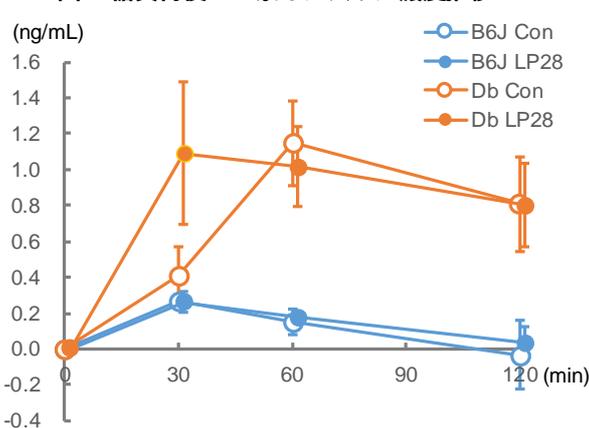


図3 糖負荷後の血漿インスリン濃度推移



く一致しており、LP28 摂取により糖尿病マウスの病態が改善したことが示唆された。なお、糖尿病マウスの糖負荷試験 2 時間値は LP28 投与により著しく改善したものの、空腹時血糖値やグリコアルブミン値に変化は認められなかった。また、レプチンや HOMA-R 値にも変動は認められなかった。

興味深いことに、糖尿病マウスにおいて、DPP-IV 濃度が LP28 摂取によって抑制される傾向が認められた。糖尿病マウスでは正常マウスと比較して DPP-IV 濃度が有意に上昇していたことから、LP28 摂取によって正常マウスのレベルに近づいたことになる。DPP-IV は血糖値低下に働くインクレチンを分解する作用があることから、DPP-IV 阻害剤が 2 型糖尿病治療薬として使用されている。本研究において DPP-IV 濃度の低下が認められたことは、糖尿病の改善に寄与することを示唆するものである。しかしながら、本実験において、インクレチンの一種である GLP-1 濃度を、糖負荷後に経時的に測定したが、LP28 摂取による差は認められなかった。さらに、摘出した膵臓におけるインクレチンレセプターの発現量を調べたが、値のばらつきが大きく、一定の傾向は見出せなかった。この点については、今後再検討が必要と考えられる。

(3) ヒト試験

本研究では、これまでに抗肥満作用評価のヒト試験で用いた LP28 死菌体の摂取量の半分で実施した。これは機能性食品として実用化する際、投与量をどこまで抑えられるかを確認するためである。

40 人が試験に組み入れられたが、開始直後に対照食群の 1 名が自己都合で参加を辞退した。また、対照食群の 1 名の妊娠が判明し、8 週までで参加を中止した他、1 名が自己都合で 4 週の検診後に脱落した。開始直後の脱落者は、割付後のデータが全く無かったため、予め定めた基準 (FAS) に従い、解析から除外した。他の 2 名については欠損値を多重代入法で補い、解析に用いた。また、これまでのヒト試験と同様、試験食や対照食摂取と因果関係が疑われるような有害事象は認められなかった。

主要評価項目である糖負荷試験では、その 2 時間値が両群で低下したが、LP28 摂取群の方が低下度が大きい傾向にあった。糖負荷試験 2 時間値のベースラインからの上昇度では、対照食群は 12 週間の摂取期間の前後比較で有意差が認められなかったのに対し、LP28 摂取群では有意に低下した。さらに、糖負荷試験後のインスリンの変化について、LP28 摂取群では摂取前よりも 2 時間後のインスリン値が下がる傾向が認められた (有意差なし)。空腹時血糖値は、12 週までの変化量に差は認められなかった。糖尿病の重要な指標である HbA1c やグリコアルブミン値、HOMA-R については、LP28 摂取群で低下する傾向にあったが、有意差は無かった。インスリン分泌指数は変化が無かった。

また、本ヒト試験では研究対象者は肥満ではなかったものの、これまでの肥満者を対象とした試験と同様に、LP28 摂取群で体重増加が抑制された。一方、体脂肪率や腹囲は、対照食群と比較すると LP28 群で好ましい方向に変化する傾向が認められたが、有意差は認められなかった。これは元々体脂肪率や腹囲の値が大きい人を対象としていなかったためと考えられる。

(4) 考察

糖尿病モデルマウスを用いた動物実験において、LP28 を 4 週間摂取することによって、食後血糖値の上昇が抑制されることが確認でき、さらにヒト試験においても同様の傾向が認められた。食後高血糖は、糖尿病の合併症の重大な危険因子とされており、この点において LP28 の効果は非常に意義深い。メタボリック症候群の因子の中で、肥満と高血糖の二つを改善する LP28 は、生活習慣病の予防・改善に大いに寄与できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 臨床試験を中心とした腸内細菌叢の変化, 東川 史子, 日本食品・機械研究会 第 7 回 腸内細菌をターゲットとした食品開発研究会, 2017 年 02 月, 大阪

(2) 植物乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28 の抗肥満作用, 水口真利江, 東川史子, 河村勇介, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 熊谷孝則, 杉山政則, 日本乳酸菌学会 2016 年度大会, 2016 年 07 月 09 日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 杉山 政則

ローマ字氏名: (Masanori Sugiyama)

所属研究機関名: 広島大学

部局名: 医歯薬保健学研究科 (薬)

職名：共同研究講座教授

研究者番号（8桁）：30106801

(2)研究協力者

研究協力者氏名：水口 真利江

ローマ字氏名：(Marie Mizuguchi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。