

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00868

研究課題名(和文) インスリン抵抗性状態における乳酸シグナルの病態学的意義の解明

研究課題名(英文) The investigation on the pathological significance for lactate in insulin resistance.

研究代表者

保坂 利男 (HOSAKA, TOSHIO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：60403698

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)：2型糖尿病患者を対象に、血清乳酸値と血清学的、体組成の指標との統計学的な検討を行った。2型糖尿病患者の空腹時血清乳酸値は、予想された糖尿病のコントロール状態や治療薬との間に関連は見いだせず、重相関解析から独立してALTと正の相関及び総ビリルビンと負の関係が見出され、肝脂肪化との関連が推測され、さらに、ビリルビンの結果からは、抗酸化作用低下と関係する可能性も考えられた。基礎研究では、飽和脂肪酸による種々の細胞においてインスリン抵抗性状態のメカニズムを解明して報告したが、それらのモデルに対する乳酸シグナルのレセプターを介しての関与は一定の見解は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病患者では、インスリン抵抗性状態で血清乳酸値の上昇を認め、更なる解析で、空腹時血清乳酸値と肝関連因子との重相関を認めたことから、乳酸値が特に、インスリン抵抗性を背景とした肝臓での従来のマーカーとは異なる、早期からの脂肪肝の新たな非侵襲マーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fasting serum lactate levels, hematological and inflammatory serum markers and anthropometric parameters, obtained employing bioelectric impedance analysis, were measured in 103 patients with T2DM. As a result, stepwise regression analysis showed ALT to be independently positively associated with total bilirubin, while being negatively associated with serum lactate levels. Furthermore, serum lactate levels were significantly higher in patients with ALT-predominant liver dysfunction. From those results, we concluded that fasting serum lactate elevation in T2DM patients to be associated with the serum levels of ALT and total bilirubin independently of blood glucose control.

At the same time, we reported the mechanism of palmitate, represented for unsaturated fatty acid, induces insulin resistance in several cell line, but not found precisely or constantly relationship to lactate receptor signaling in those cells.

研究分野：栄養代謝

キーワード：乳酸 糖尿病 インスリン抵抗性 GPT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸は古くは運動後嫌気性状態から筋肉中に増加するグルコース代謝物または肝臓での糖新生の基質と考えられていた。近年の遺伝子学的解析により、乳酸は生理活性物質として、細胞膜に存在する有機酸レセプター(HCA1)に作用してインスリンによる中性脂肪蓄積に重要と推測されている。この作用により、血清遊離脂肪酸が低下することで、筋肉などは、エネルギー減として効率よくグルコースを利用するようになることと推測されている。血清乳酸は臨床検討よりインスリン抵抗性で増加、糖尿病状態ではさらに増加することや、BMI値と血清乳酸値が相関することもわかっているがその病態的意義は不明である(図1)。臨床データへの一部関与も考えられる基礎データとして、培養実験での肥大化した脂肪細胞や高脂肪食マウスの脂肪細胞で乳酸分泌の増加が報告されているが、その生理、分子メカニズムは全く解明されていない。さらに基礎研究で乳酸は筋肉培養細胞、マクロファージでは炎症惹起、肝臓、膵臓細胞では抗炎症と相反する作用が報告されているが、このメカニズムも乳酸レセプター後のシグナルによるものかなど細胞内でのこの相反する作用を制御するメカニズムは全くわかっていない。

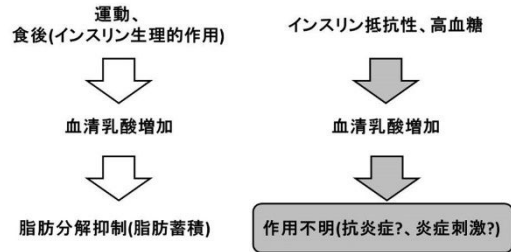


図1 乳酸の推測される生体内作用

2. 研究の目的

栄養シグナルとして注目される乳酸は、生理的には、インスリンによる中性脂肪分解抑制作用に関与することやインスリン抵抗性、糖尿病状態での血清乳酸値が増加、および基礎研究において、炎症惹起、抗炎症など相反する作用が報告されており、病態学的意義は未だはっきりとしていない。本研究では乳酸シグナルの病態学的メカニズムの解明による種々のインスリン抵抗性状態における血清乳酸増加の意義を明確として、基礎、臨床のエビデンス発信による食事運動療法、糖尿病治療戦略および健康増進の新規アプローチの基盤とする。

3. 研究の方法

- 1) 健常者、肥満・糖尿病患者の乳酸値と血清マーカー(インスリン、遊離脂肪酸、炎症性サイトカイン)や体格などのパラメーター、食事調査(FFQ)、運動調査との解析と糖・食事負荷後(標準食、高脂肪食、低炭水化物食など)の経時的な血清パラメーターとの分析から血清乳酸増加に関与する因子の探索の臨床研究をおこなった。
- 2) 培養細胞株(主に脂肪細胞株 3T3-L1)で血糖濃度(1mM-25mM)、インスリン濃度(1-100nM)、パルミチン酸負荷状態での乳酸分泌、HCA1発現制御および乳酸同時負荷による脂質代謝、インスリン抵抗性、酸化ストレス制御、細胞内炎症の探索を遺伝子操作法やシグナル阻害薬を駆使して多角的な解析をおこなう。

4. 研究成果

1) 103例の種々の因子を解析して、単相関分析では、乳酸値は、空腹時血糖値、HbA1cとの相関は小さく、体重、血清Cペプチド、インスリン、AST、ALT、総ビリルビン、アディポネクチン、中性脂肪、LDL-C、HDL-C、HOMA-R、皮下脂肪量、体脂肪率、体脂肪量、内臓脂肪量、BMIとの単相関を認めた。これらにHbA1c、空腹時血糖値、3-ヒドロキシ酪酸を加え、ステップワイズ法による重回帰分析を行ったところ、説明変数として、ALT(正相関)、総ビリルビン(負相関)が有意性を示した(表1)。また、血清乳酸値はALT優位の肝障害群で正常群と比べ有意に高値を認めた(図2)。既知の肝障害の指標であるγ-GTP、ALPおよび、肝線維化の指標であるFIB-4 indexとの相関はなかった。また、血清乳酸値は、ビッグアノイド薬服用の有無での有意な差は認めなかった。図2で有意に増加した17例から同意書の得られた10例で前向きにALTと乳酸値の変化を治療介入などせずに観察研究をおこなったが、ALTに関してわずかに変動はあるが正常化せず、わずかな変動のみでは、それと対応しての乳酸値の変化は認めなかった。2型糖尿病患者では、空腹時血清乳酸値と肝関連因子との重相関を認め、乳酸値が特に、早期の肝脂肪化の新たな非侵襲マーカーとなりうる可能性が示唆された。

Variable	Parameter Estimate	Standardized Estimate (β)	p
Intercept	8.86E+00	5.534E-17	< 2E-16***
ALT	8.74E-02	4.518E-01	1.32E-06***
Total bilirubin	-2.06E+00	-2.151E-01	0.0162*

Multiple R-squared (R²): 0.514, Adjusted R-squared (R²): 0.433. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

表1 重回帰分析の結果

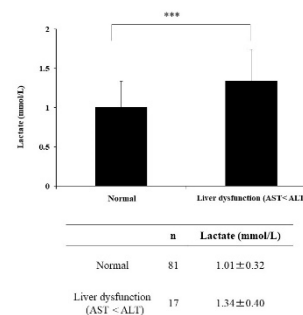


図2

- 2) 3T3L-1細胞を使用して、既報にある血糖濃度、インスリン濃度を振って、インスリンシグナ

ルタンパクやグルコーストランスポータの発現の変化は認められたが、HCA1の発現の変化に関しては、一定した結果は認められなかった。一方で、パルミチン酸によるインスリン抵抗性の指標として、MCP-1の発現、分泌増加を系として、AMPKシグナルがMCP-1の分泌を抑制することを見出し報告したが(図3)、生理的な濃度での乳酸シグナルの相乗または抑制効果やHCA1の発現に関しては一定した結果は認められなかった。現在細胞を変えて、パルミチン酸による炎症惹起効果のメカニズムの検討をおこなっており、同様に乳酸シグナルについても細胞を変えての検討が必要と思われたが、現在のところ病態生理的な乳酸の関与は今回の培養細胞での検討では、不明であり、実験系の検討を含めて、更なる検討が必要と思われる。

脂肪細胞での不飽和脂肪酸によるMCP1
発現増加は、AMPK活性化刺激によって、抑制される

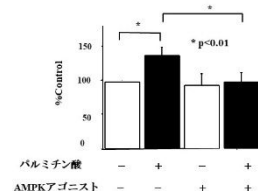


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishitobi Minori, Hosaka Toshio, Morita Naru, Kondo Ken, Murashima Toshitaka, Kitahara Atsuko, Takahashi Kazuto, Sumitani Yoshikazu, Tanaka Toshiaki, Yokoyama Toshihiko, Kondo Takuma, Ishida Hitoshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Serum lactate levels are associated with serum alanine aminotransferase and total bilirubin levels in patients with type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Research and Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.diabres.2019.01.028	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 該当する

1. 著者名 Morita N, Hosaka T, Kitahara A, Murashima T, Onuma H, Sumitani Y, Takahashi K, Tanaka T, Kondo T, Ishida H	4. 巻 なし
2. 論文標題 Novel mechanisms modulating palmitate-induced inflammatory factors in hypertrophied 3T3-L1 adipocytes by AMPK.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Research	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/9256482	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 該当する

1. 著者名 Ito S, Hosaka T, Yano W, Itou T, Yasumura M, Shimizu Y, Kobayashi H, Nakagawa T, Inoue G, Tanabe S, Kondo T, Ishida H	4. 巻 なし
2. 論文標題 Metabolic Effects of Tofogliflozin are Efficiently Enhanced with Appropriate Dietary Carbohydrate Ratio and are Distinct from Carbohydrate Restriction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 physiological Reports	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13642.	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石飛実紀、保坂利男、森田奈瑠、村嶋俊隆、小沼裕寿、炭谷由計、田中利明、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題 糖尿病患者における血清乳酸値増加の意義-インスリン抵抗性非侵襲代謝マーカーとしての可能性-
3. 学会等名 第115回日本内科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田奈瑠, 保坂利男, 北原敦子, 村嶋俊隆, 小沼裕寿, 炭谷由計, 田中利明, 近藤琢磨, 石田均
2. 発表標題 肥大化3T3-L1脂肪細胞でのパルミチン酸誘導炎症性サイトカイン発現に対するAMPKの影響とその細胞内機構の検討.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石飛実紀, 保坂利男, 森田奈瑠, 村嶋俊隆, 小沼裕寿, 高橋和人, 炭谷由計, 田中利明, 近藤琢磨, 石田均
2. 発表標題 糖尿病患者における血清乳酸値増加の意義 インスリン抵抗性非侵襲代謝マーカーとしての可能性.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石飛実紀, 保坂利男, 森田奈瑠, 近藤健, 村嶋俊隆, 高橋和人, 炭谷由計, 田中利明, 近藤琢磨, 石田均
2. 発表標題 糖尿病患者における血清乳酸値増加の意義-インスリン抵抗性非侵襲代謝マーカーとしての可能性-.
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石飛実紀, 保坂利男, 森田奈瑠, 近藤健, 村嶋俊隆, 高橋和人, 炭谷由計, 田中利明, 近藤琢磨, 石田均
2. 発表標題 血清の肝脂肪非侵襲マーカーの可能性; 糖尿病患者において空腹時乳酸値と肝脂肪化マーカーとが関連する.
3. 学会等名 第33回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	森田奈瑠、保坂利男、北原敦子、村嶋俊隆、五林可織、小沼裕寿、炭谷由計、高橋和人、田中利明、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題	肥大化脂肪細胞での炎症性サイトカイン発現に対するAMPK活性化の影響とメトフォルミンの効果について
3. 学会等名	第60回日本糖尿病学会学術集会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Morita N, Hosaka T, Kitahara A, Murashima T, Onuma H, Sumitani Y, Takahashi K, Tanaka T, Kondo T, Ishida H.
2. 発表標題	The Effect of AMPK Activation on Inflammatory Cytokine in Mature Hypertrophied 3T3-L1 Adipocyte
3. 学会等名	American Diabetes Association 77rd scientific sessions (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	森田奈瑠、保坂利男、北原敦子、高橋和人、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題	肥大化脂肪細胞での炎症性サイトカイン発現に対するAMPK活性化の影響とその生理的役割について
3. 学会等名	第38回日本肥満学会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	森田奈瑠、保坂利男、北原敦子、村嶋俊隆、小沼裕寿、五林可織、炭谷由計、高橋和人、田中利明、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題	肥大化脂肪細胞でのAMPK活性化が及ぼす炎症性サイトカイン発現に対する影響とその細胞内機構の検討
3. 学会等名	第32回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 石飛実紀、保坂利男、石本麻衣、近藤健、森田奈瑠、村嶋俊隆、小沼裕寿、炭谷由計、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題 糖尿病患者における血清乳酸値増加の意義-インスリン抵抗性非侵襲タイヤマーカーとしての可能性-
3. 学会等名 第21回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田奈瑠、保坂利男、北原敦子、村嶋俊隆、小沼裕寿、五林可織、高橋和人、炭谷由計、西田進、近藤琢磨、石田均
2. 発表標題 肥大化脂肪細胞でのサイトカイン発現におけるAMPK活性化の影響とその生理的役割について
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 北原敦子、高橋和人、村嶋俊隆、近藤健、石飛実紀、保坂利男、近藤琢磨、石田均、安田和基
2. 発表標題 細胞におけるパルミチン酸誘導性炎症反応へのアスタキサンチンの効果とオートファジー機構の関与
3. 学会等名 第23回日本病態栄養学会
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	石田 均 (ISHIDA HITOSHI) (80212893)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	