

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01870

研究課題名(和文) 高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性と腸内フローラの変化との関連の検討

研究課題名(英文) Investigation of association between gut microbiota and insulin resistance by high-fat diet

研究代表者

金澤 昭雄 (Kanazawa, Akio)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30407259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：21人の非肥満、健常男性を対象として、標準食6日間摂取後、6日間の高脂肪食摂取(飽和脂肪酸60-70%程度含有)の負荷を行った。高脂肪食負荷前後でグルコースクランプ法により、インスリン感受性を評価し、また、便中の腸内細菌叢の解析と血液中のリポポリサッカライド結合タンパク(LBP)の濃度を測定した。

高脂肪食負荷後で筋肉と肝臓でのインスリン感受性は低下し、血液中のLBPは有意に上昇した。また、脂肪食負荷前のバクテロイデス門の占有率はインスリンクリアランスと筋肉でのインスリン感受性と負の相関関係を示した。結論、高脂肪食の負荷により、インスリン感受性は低下し、代謝性エンドトキシン血症は増悪した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は健常人でも短期間の高脂肪食摂取はインスリン感受性を低下させるとともに、腸管内の毒素であるエンドトキシンを血液中へ移行させる可能性を示している。また、バクテロイデス門の細菌叢を多く有するほど、高脂肪食負荷後にインスリン感受性は低下した。これらの結果は腸内細菌叢の構成により、食事指導の方法を考慮する必要があり、将来のメタボリックシンドロームの予防につながる研究成果といえる。

研究成果の概要(英文)：We recruited 21 healthy non-obese men and evaluated lipopolysaccharide (LPS) binding protein (LBP), a marker of endotoxemia and gut microbiota before and after 6-day high-fat diet consisting of saturated fatty acids (60-70%). By using a 2-step hyperinsulinemic euglycemic clamp, we evaluated tissue specific insulin sensitivity. After the high-fat diet, insulin sensitivity in liver and muscle was significantly decreased. In addition, circulating LBP was significantly increased after the high-fat diet. Baseline relative abundance of Bacteroidetes, LPS-producing Gram-negative gut microbiota, was negatively correlated to metabolic clearance rate of insulin and insulin sensitivity in muscle. In conclusion, short-term high-fat diet decreased insulin sensitivity and increased metabolic endotoxemia.

研究分野：腸内細菌叢

キーワード：腸内細菌叢 インスリン抵抗性 高脂肪食 バクテリアルトランスロケーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本における糖尿病患者数の増加は著しく、早急にその予防を考える必要がある。糖尿病発症の要因には、遺伝因子と環境因子がある。環境要因に関しては、運動不足、食生活の変化(欧米化)が糖尿病発症に関与することが知られており、その結果もたらされる過栄養状態がインスリン抵抗性を惹起して2型糖尿病の発症に関与するとされている。そのため、日本においても肥満が2型糖尿病の重要な発症要因であることが予想されるが、日本で行われた大規模臨床試験である Japan Diabetes Complications Study での糖尿病患者の平均 BMI は  $23 \text{ kg/m}^2$  と正常レベルであり、欧米のそれ ( $30 \text{ kg/m}^2$ ) と比べて極めて低いことが明らかとなっている。実際に、日本人の平均摂取エネルギー量は、最近 50 年で、ほとんど変化しておらず、過剰なエネルギー摂取  
肥満 インスリン抵抗性 2 型糖尿病発症という欧米でよく認められる糖尿病発症機序は日本人で多く見受けられる非肥満 2 型糖尿病の病態には必ずしも合致していない。以前に比べ、日本人の運動量は減少しており、エネルギー摂取量と消費量とのバランスは正に傾きつつあることは間違いないが、これだけでは今日の日本における糖尿病患者数の増加は説明できず、非肥満の 2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性の発症機序に関しては未だ不明の部分が多い。そのような状況で注目されているのがインスリン抵抗性と腸内細菌叢との関係である。特に高脂肪食の摂取では腸内細菌叢のバランス異常 (dysbiosis) を生じ、腸管でのバリア機能の低下、つまり透過性の亢進をきたす。透過性の亢進は腸内細菌及び、その成分の血中への移行 (bacterial translocation) をもたらし、炎症性サイトカインの増加を介して、微小な慢性炎症を宿主である人間に惹起し、肥満、糖尿病におけるインスリン抵抗性の一因となっているが、非肥満の健常日本人の腸内細菌叢が高脂肪食負荷でどのように変化し、インスリン抵抗性の一因と成りえるかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

我々は非肥満の健常成人を対象として、高脂肪食負荷前後で便中の腸内細菌叢解析を行い、グルコースクランプ法によるインスリン抵抗性の評価を行うことで腸内細菌叢の変化とインスリン抵抗性との関連を検討することを主要な目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 高脂肪食負荷の方法

本研究は探索的研究である。

21 名の BMI ( $18.5 \text{ kg/m}^2$  以上  $25 \text{ kg/m}^2$  未満) の非肥満の若年 (20 歳 ~ 29 歳) の健常日本人男性を対象とし、標準食摂取 6 日後と高脂肪食摂取 6 日後に採血、グルコースクランプ、便採取を行った。食事介入方法: 標準食 6 日間摂取後、6 日間の高脂肪食負荷 [標準食 ( $1800 \text{ kcal/日程度}$ ) + 高脂肪 ( $900 \text{ kcal/日}$ )、計約  $2700 \text{ kcal/日}$  (組成: 脂肪: 約 50%、炭水化物: 約 38.3%、タンパク: 約 11.7%)]、標準食: ベースカロリー: (脂肪: 約 25%、炭水化物: 約 57.5%、タンパク: 約 17.5%) (日本人の食事摂取基準 2015、厚生労働省) その後、高脂肪食として、標準食にオフトクリーム (1 パック:  $160 \text{ g}$ 、 $547.2 \text{ kcal}$ ) を +50% カロリー負荷量として使用した (脂肪: 乳脂肪: 約 99%、炭水化物: 乳糖: 約 0.3-0.5%、タンパク質: 乳タンパク: 約 0.3-0.4%) (上毛食品工業) (パルミチン酸やオレイン酸等を含む)。

### (2) インスリン感受性の指標と腸内細菌叢の解析

インスリン感受性の指標: 高インスリン正常血糖クランプを施行した。人工膵臓 (STZ-22; 日機装社製) を用いてインスリンを  $10 \text{ U/m}^2/\text{min}$  の速度で投与、目標血糖値を  $95 \text{ mg/dl}$  として、3 時間の正常血糖クランプ検査を行い、最後の 20 分の内因性糖産生の抑制率を肝臓のインスリン感受性の指標とした。引き続きインスリンを  $40 \text{ U/m}^2/\text{min}$  の速度で投与、目標血糖値を  $95 \text{ mg/dl}$  として、3 時間の正常血糖クランプ検査を行い、最後の 20 分の糖消失率を末梢でのインスリン感受性の指標とする。腸内細菌叢の解析は糞便中より細菌 DNA を抽出し、16S-rRNA アンプリコン解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 高脂肪食負荷前後での体組成、血液データの変化

6 日間の高脂肪食負荷後において体重は  $60.8 \pm 6.1 \text{ kg}$  から  $61.2 \pm 6.0 \text{ kg}$  へと有意に増加した ( $p=0.031$ )。また、In body で測定した筋肉量は  $49.8 \pm 5.0$  から  $50.4 \pm 5.1 \text{ kg}$  へと有意に増加したが ( $p=0.044$ )、体脂肪率は  $13.1 \pm 3.1\%$  から  $12.7 \pm 3.1\%$  へと有意な変動は認めなかった。また、空腹時血糖値は  $86.6 \pm 5.6 \text{ mg/dl}$  から  $90.5 \pm 5.4 \text{ mg/dl}$  へ ( $p=0.012$ )、総コレステロール値は  $152.8 \pm 19.7 \text{ mg/dl}$  から  $161.0 \pm 23.2 \text{ mg/dl}$  へ増加したが ( $p=0.022$ )、LDL-コレステロール値は有意な変動を認めなかった。

### (2) 高脂肪食負荷前後での炎症性サイトカインの変化 (表 1)

表 1 に高脂肪食負荷前後での結果を示す。高脂肪食負荷後で高・中分子アディポネクチン、またレプチンが有意に増加した。さらに、bacterial translocation のマーカーである LBP も脂肪食負荷後に有意に増加した。しかし、炎症性サイトカインである IL-6 と TNF- $\alpha$  は有意に変動を示さなかった。高感度 C 反応性タンパクは有意ではないが増加傾向を認めた。つまり、6 日間という短期間ではあるが、高脂肪食の摂取により、bacterial translocation が誘導され、微小な炎

症が惹起される傾向であった。

高脂肪食負荷前後でのアディポサイトカイン、炎症マーカーの変化 (表 1)

	負荷前	負荷後	p 値
総アディポネクチン (µg/ml)	1.93 ± 1.30	2.14 ± 1.42	0.021
高分子アディポネクチン (µg/ml)	1.93 ± 1.30	2.14 ± 1.42	0.021
中分子アディポネクチン (µg/ml)	1.11 ± 0.57	1.32 ± 0.60	0.022
低分子アディポネクチン (µg/ml)	2.33 ± 0.67	2.35 ± 0.60	0.531
IL-6 (pg/ml)	1.2 ± 2.3	1.2 ± 1.7	0.984
レプチン (ng/ml)	4.5 ± 1.6	5.0 ± 1.7	0.048
高感度 C 反応性タンパク (ng/ml)	157.0 ± 308.8	224.3 ± 228.6	0.073
LBP (LPS 結合タンパク) (µg/ml)	4.9 ± 0.7	5.6 ± 0.7	0.006
TNF- (pg/ml)	0.70 ± 0.18	0.68 ± 0.16	0.365

注釈：LBP は腸管から血液中へ移行したリポポリサッカライドと結合し、炎症を誘導するタンパクである。LBP: lipopolysaccharide binding protein、TNF- : tumor necrosis factor-

( 3 ) 高脂肪食負荷前後でのインスリン感受性の変化 (表 2)

	負荷前	負荷後	p 値
内因性糖産生 (mg/m <sup>2</sup> /min)	76.9 ± 3.4	79.4 ± 4.7	0.023
肝インスリン感受性 (%/µU·ml <sup>-1</sup> )	4.46 ± 0.85	4.09 ± 0.97	0.044
骨格筋インスリン感受性 (mg/kg FFM·min <sup>-1</sup> /µU·mL <sup>-1</sup> )	0.24 ± 0.06	0.23 ± 0.05	0.042

表 2 は高インスリン正常血糖クランプ法により評価したインスリン感受性の高脂肪食負荷前後の結果である。内因性糖産生の上昇認め、肝インスリン感受性、骨格筋インスリン感受性の有意な低下を認めた。また、インスリンクリアランス (692.4 ± 94.1 から 653.1 ± 99.7, p=0.004) は高脂肪食負荷後に有意に低下した。

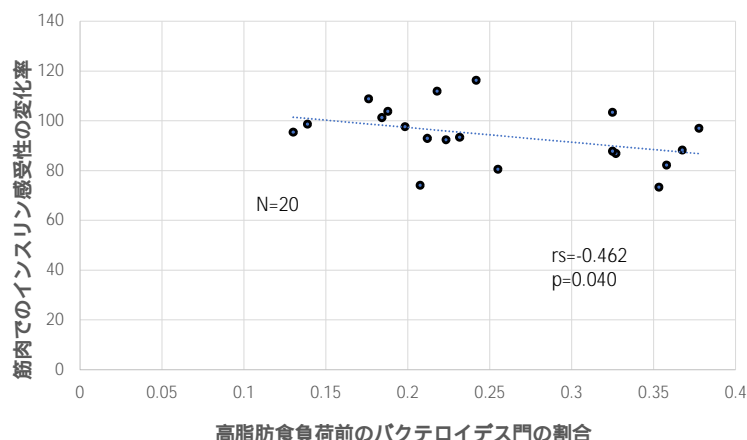
( 4 ) 高脂肪食負荷前後での腸内細菌叢の変化 (表 3、門レベルでの解析)

	負荷前	負荷後	p 値
Actinobacteria 門 (%)	6.89 ± 4.86	9.73 ± 5.66	0.005
Bacteroidetes 門 (%)	25.19 ± 7.88	25.79 ± 9.00	0.970
Cyanobacteria 門 (%)	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.109
Firmicutes 門 (%)	63.05 ± 9.72	60.91 ± 11.14	0.232
Fusobacteria 門 (%)	1.75 ± 2.76	1.41 ± 2.59	0.156
Proteobacteria 門 (%)	2.82 ± 3.33	2.16 ± 1.04	0.970

高脂肪食負荷後にアクチノバクテリア門の占有率が有意に増加したが、その他の門レベルの解析では有意な変動は認めなかった。また、アクチノバクテリア門の菌であるビフィドバクテリウム門の占有率が脂肪食負荷後に増加傾向を示した。

( 5 ) 腸内細菌叢、LBP とインスリン感受性との関連 (図 1、縦・横軸は%)

下図に示すように高脂肪食負荷前後における筋肉でのインスリン感受性変化率と負荷前のバクテロイデス門の占有率とは負の相関関係を認めた。また、インスリンクリアランスもバクテロイデス門の占有率と負の相関関係を認めた。つまり、バクテロイデス門の腸内細菌叢を多く含有する被験者ほど筋肉でのインスリン感受性は悪化した。また、高脂肪食負荷後に LBP が増加するほど、つまり、bacterial translocation を起こしやすいほど、空腹時の血中インスリン値は高値であった (r=0.435, p=0.049)。さらに、脂肪食負荷前後での LBP 変化率と高感度 C 反応性タンパクの変化は有意な正の相関関係 (r=0.545, p=0.011) を認めており、LBP が増加するほど炎症も強くなる現象が確認された。



#### (6) 考察と本研究の意義

本研究では生活習慣病を発症していない健常人において6日間という短期間の高脂肪食摂取でも腸内細菌叢が変化し、インスリン感受性が悪化することが明らかになった。ホルモンレベルの変化としてはアディポネクチンなどのインスリン感受性を改善させるホルモンは上昇、ビフィドバクテリウムなどの善玉菌の増加傾向を認めるなど、高脂肪食によるインスリン感受性悪化に対するホルモン及び、腸内細菌叢の反応が認められた。高脂肪食摂取は腸内細菌叢を変化させ、腸管バリア機能を低下させ、bacterial translocationを誘導させるが、短期間の高脂肪食でもLBPが増加した。さらに、リポポリサッカライドを構成成分として有するグラム陰性菌を多く含むバクテロイデス門が多いほど、脂肪食摂取後のインスリン感受性が低下しやすい結果となり、腸内細菌叢の構成と高脂肪食による炎症の誘導、インスリン感受性との関連が示唆された。このことは、生活習慣病の発症前から腸内環境を意識した食事指導などが将来のメタボリックシンドローム発症の予防につながる可能性を示すものといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門脇 聡、金澤昭雄
2. 発表標題 Higher relative abundance of Bacteroidetes in gut microbiota is associated with decreased insulin clearance and insulin sensitivity after a short-term high-calorie, high-fat diet in healthy men
3. 学会等名 第80回米国糖尿病学会
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
研究協力者	門脇 聡  (Kadowaki Satoshi)		