

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K01905

研究課題名(和文)日本人型糖尿病モデルラットの軟食飼育が糖尿病と咀嚼器官の発達と老化に及ぼす影響

研究課題名(英文)Characteristic of the masticatory apparatus in the type2 diabetes model rats caused by soft diet feeding.

研究代表者

永田 順子(Nagata, Junko)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：50264429

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)：本研究では、先行研究で開発した2型糖尿病モデルラットの顎骨と咀嚼筋、口腔・腸内細菌の特徴を調べた。糖尿病モデル群では対照群より皮下脂肪率と内臓脂肪率が有意に高く、高血糖と高インスリン血症を呈し、糖代謝異常が確認された。糖尿病モデル群では対照群に比べ下顎骨密度が小さかった。筋組織はヒラメ筋で速筋化していたが、咬筋と腓腹筋では遅筋化し、顎二腹筋では差がなかった。咬筋では筋肉分解に関わるFoxo1 mRNAの発現が有意に増加していた。糖尿病モデル群では口腔内細菌のFirmicutesの比率には差がなかったが、腸内細菌叢ではFirmicutesの比率が増大し、内臓脂肪率と正の相関を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年急増する糖尿病は、心血管や腎障害等の重篤な合併症、筋力・身体機能・認知機能の低下や全身的フレイルを来すため、社会問題となっている。軟食を制限給餌することで作出した2型糖尿病モデルラットは、顕著な過食・肥満を伴わず耐糖能異常やインスリン抵抗性を示す日本人型2型糖尿病に近い病態を示す。歯科領域では、軟食摂取で咀嚼器官の発達不良を来すことが知られてきた。顎口腔機能の虚弱化(オーラルフレイル)は老化や全身的フレイルの前兆として注目されている。本研究で、軟食や短時間給餌に伴う「早食い」の食習慣と、咀嚼器官の形態や歯周病、糖尿病発症との関連が示されれば、身近な予防策の提示に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we compared the morphological characteristics of jaw bones and masticatory muscles as well as the oral and intestinal bacterial flora between the Type 2 diabetes model rat group and the control group.

In the test group, the bone density of the mandible was significantly lower than that of the control group. The soleus muscle was significantly more converted into fast muscles, whereas the masseter and the gastrocnemius muscles showed significantly greater conversions into slow muscles compared with the control group. The test group also showed significant increase of Foxo1 mRNA expression in the masseter muscle. In the test group, the proportion of the firmicutes in the intestinal bacterial flora was significantly higher, whereas there was not inter-group difference in the oral bacterial flora. The proportion of the firmicutes in the intestinal bacterial flora showed a significant positive correlation with the visceral fat percentage.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：2型糖尿病 ラット 咀嚼筋組成 口腔細菌 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当グループでは、先行研究で、軟性餌を短時間ラットに与えることで、明らかな過食・肥満がないにもかかわらず耐糖能異常、インスリン抵抗性、膵ラ氏島の過形成を示す日本人型2型糖尿病に近い2型糖尿病モデルラットを作出している^{1,2)}。一方、軟性餌でラットやマウスを飼育すると、対照群と比べて顎骨や咀嚼筋、唾液腺など咀嚼器官の様々な発達不良を呈することが知られている³⁾。また、糖尿病が歯周病と相互に関連することが知られている。2型糖尿病モデルラットは肥満のない日本人型糖尿病と歯周病や咀嚼器官の発達不全を含めた顎口腔疾患との病態関連の検討に有用なモデルと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Soft食群を制限給餌で与えて作出する2型糖尿病モデルラット (soft群) と、標準試料で飼育したラット (control群) を対象に、顎骨、咀嚼筋、および口腔細菌叢と腸内細菌叢の特徴の違いを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

すべての実験は、日本生理学会の動物飼育ガイドラインに従い、研究プロトコルは、宮崎大学医学部動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

飼育方法、実験方法の詳細は、過去の報告に準じて行った^{1,2)}。7週齢の雄のウイスターラット (チャールズレイバー社) 30匹を用いた。ランダムに2つの群に分け (各群15匹)、清潔なケージ内で飼育し、control群では標準飼料 (4.6%脂肪、51%炭水化物、25%タンパク質; 日本クレア社)。Soft食群では標準飼料を粉碎化したものに1gあたり1.4mlの水を加えて混合したものを、朝9時から正午までの3時間のみ給餌させた。摂水は自由にできる環境とした。

体重とカロリー摂取量は、飼育開始時から実験の全体を通じて週1回モニターされた。

各群5匹について、イソフルラン麻酔下にて採血ラットの尾静脈から血液検体を採取し、直ちに遠心分離後、-80℃で保管した。血漿CCK、GLP1、PYYとインスリンレベルの測定にはELISAキットを用いた。血液グルコースの測定にはグルコメーターを用いた。糖負荷試験は12時間絶食後、朝9時に2g/kgの体重ブドウ糖腹腔内投与により行った。注射 (時点0)、注射の後の15、30、60、90、120と180分に尾静脈から採取した血液から、血糖と血漿インスリンレベルの測定を行った。

各群10匹について、イソフルラン麻酔下でペンダブラシマイクロ (Centrix, USA) を用いて歯頸部を刷掃して口腔細菌を採取し、排泄直後の糞から腸内細菌を採取し、直ちに凍結し-80℃で保存した。これらの検体からDNAを抽出してPCR解析を行った。

飼育開始から24週後に、ペントバルビタール麻酔下にて、実験動物用マイクロCT装置 (ラシータLCT-200, 日立アロカメディカル社) を用いて腹部と頭部の画像を撮影した。マイクロCT画像からL1-L6の高さで皮下脂肪率と内臓脂肪率を分析した。頭部のマイクロCT画像から臼歯の位置で下顎骨の骨密度を分析した。また、CTデータを三次元解析ソフトで表示し、顎骨形態の解析を行った。

CT撮影後、soft食群、control群ともに解剖を行い、咬筋浅層、顎二腹筋前腹、腓腹筋、ヒラメ筋を採取し直ちに凍結し-80℃で保存した。筋線維タイプの指標分子であるミオシン重鎖 (MyHC) アイソフォームを解析した。

4. 研究成果

(1) soft食群と対照群の体重と摂取カロリーの推移

体重およびカロリー摂取量において、soft食群と対照群には、飼育期間を通して有意な差は認めなかった (図1)。

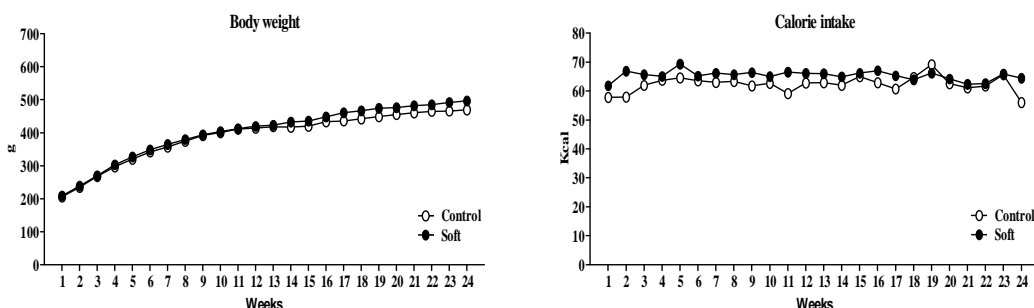


図1. 実験期間中の体重とカロリー摂取量の推移

(2) 皮下脂肪・内臓脂肪の比較 (図 2)

soft食群では対照群に比べて皮下脂肪率 (P<0.05) と内臓脂肪率 (P<0.01) が有意に高く、除脂肪体重 (LBM) 有意に低かった (P<0.01)。

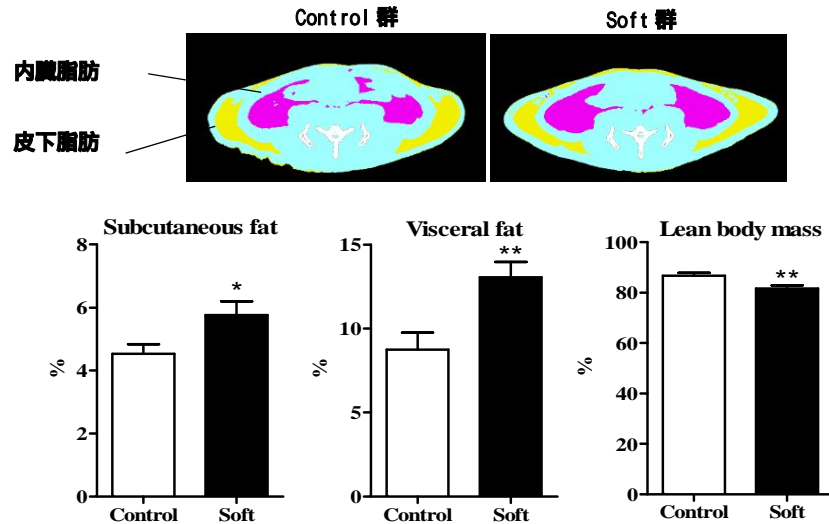


図 2 . 腹部 X 線 CT 解析 (L1-L6) 皮下脂肪率、内臓脂肪率、除脂肪体重 (LBM) の比較

(3) グルコース負荷試験による血糖値と血漿インスリン値

soft群の血中グルコース濃度はcontrol群に比べて高く、グルコース負荷後15分、30分、60分後で有意に高い値を示した (15分・30分後:P<0.01, 60分後:P<0.05)。また、血中インスリン値もsoft群でcontrol群に比べて高く、負荷後60分後で有意に高い値を示した (P<0.05)。以上から、soft群で糖代謝異常が確認された (図 3)。

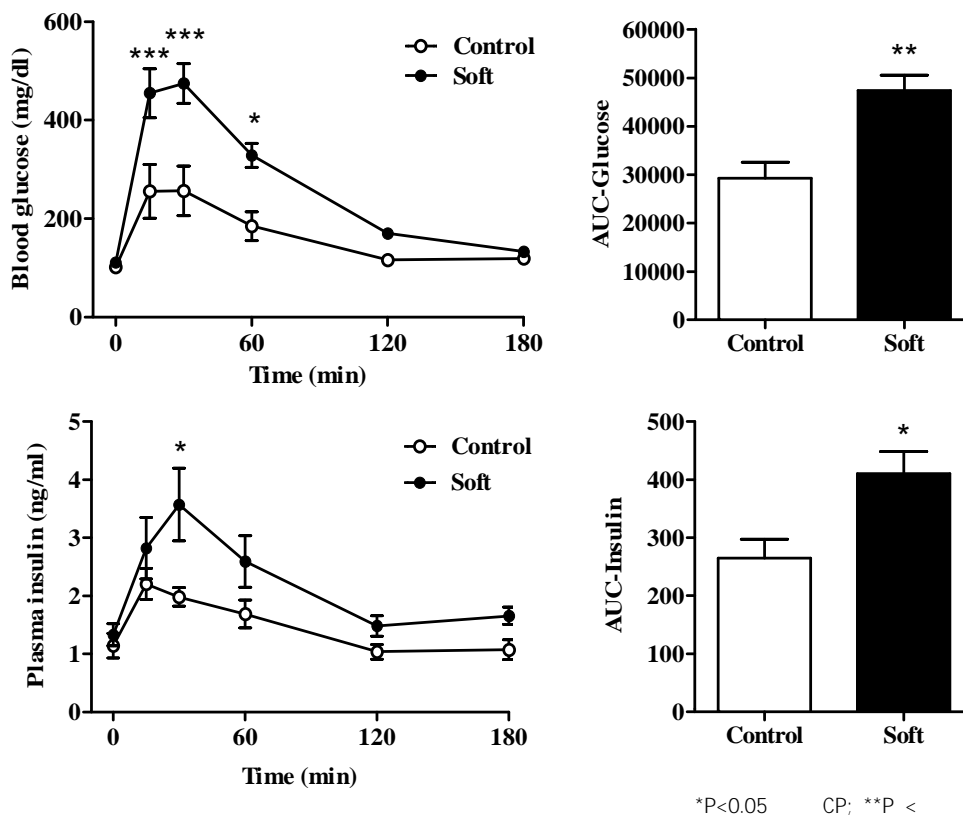


図 3 . グルコース負荷試験における血糖値と血中インスリン値の比較

*P<0.05 CP; **P <

(4) 顎骨形態と骨密度

マイクロCT 画像の分析・計測から、soft食群では対照群に比べ下顎骨の臼歯部領域における皮質骨密度 (P<0.01)、海面骨密度 (P<0.05)、および全骨密度 (P<0.05) が有意に小さかった (図4)。

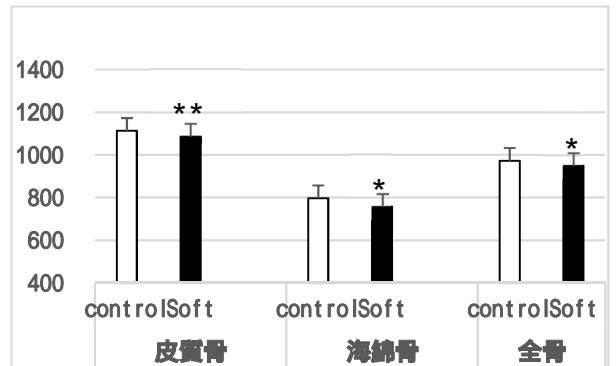
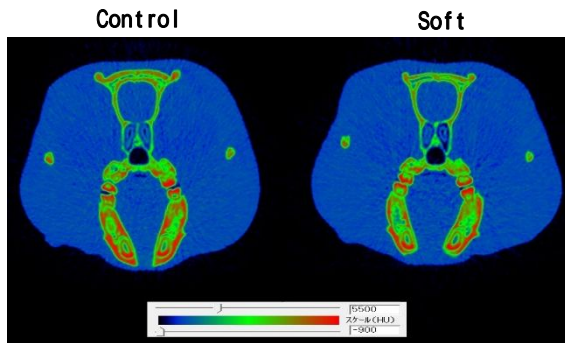


図4 . 両群の下顎骨における骨密度の比較

また、マイクロCT 画像の3D分析・計測から、soft食群ではcontrol群に比べて下顎角、下顎頭、下顎枝高さが小さく、顎骨形態にも変化を生じていることが確認された (図5)。

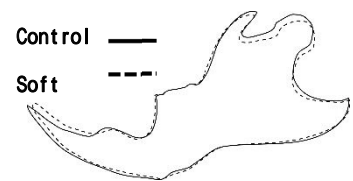


図5 . 両群の下顎骨形態の比

(5) 咀嚼筋と骨格筋の筋組成

ミオシン重鎖 (MyHC) アイソフォーム解析から、筋組織はヒラメ筋で速筋化していたが、咬筋と腓腹筋では遅筋化し、顎二腹筋では差がなかった (図6)。また、咬筋では筋肉分解に関わるFoxo1 mRNAの発現が有意に増加していた (図7)。

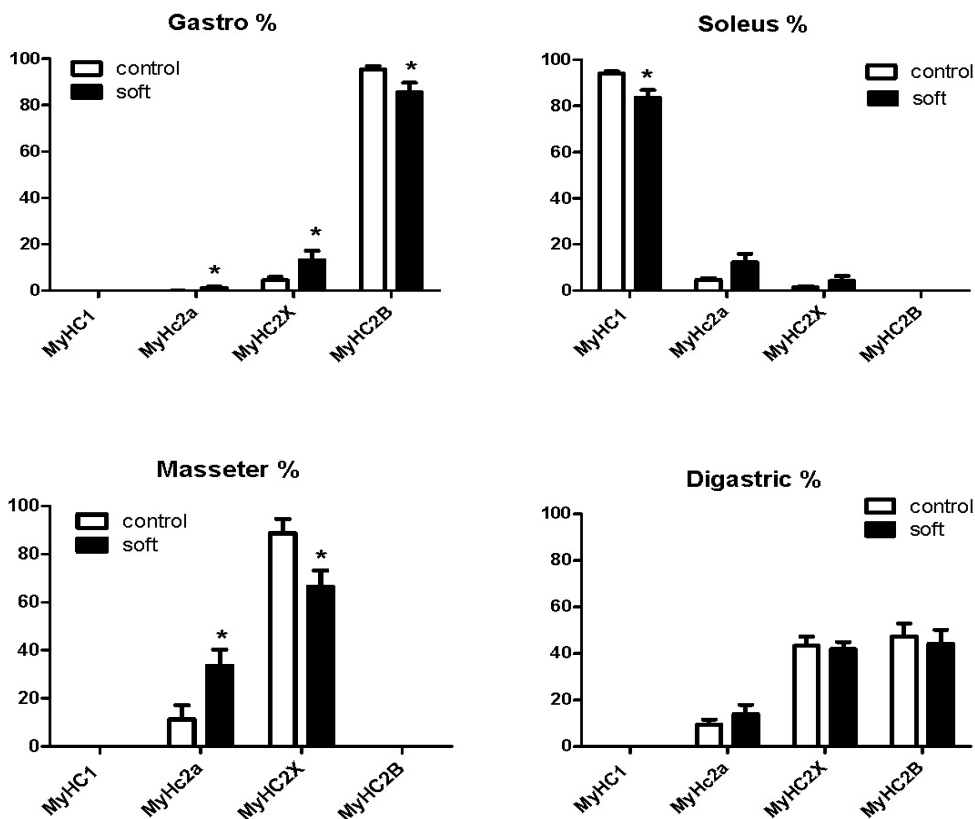


図6 . 骨格筋・咀嚼筋における筋組織組成の比較

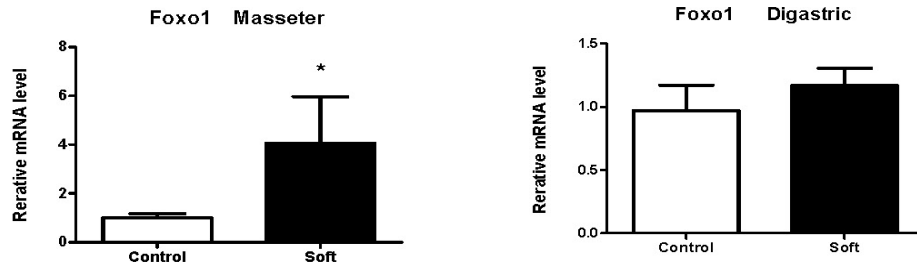


図7. 咀嚼筋における Foxo1 mRNA の発現レベルの比較

(6) 口腔細菌叢と腸内細菌叢

口腔内細菌ではcontrol群とsoft食群の間に差がなかったが(図8)、soft食群ではcontrol群に比べて腸内細菌叢のFirmicutes門の比率が増大し、さらにFirmicutes門の増大は内臓脂肪率と正の相関があることが示された(図9)。

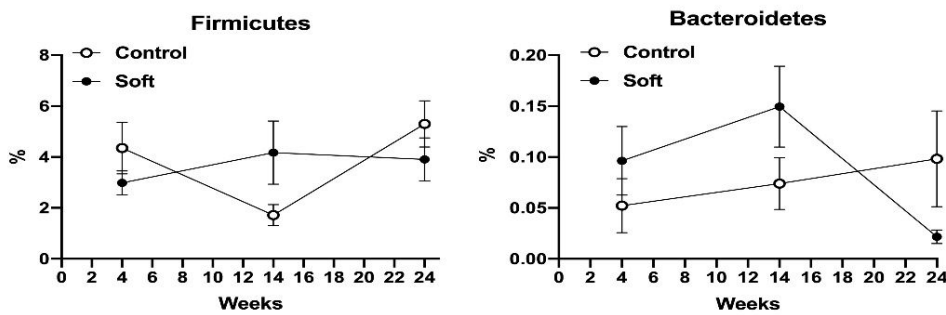


図8. 口腔内細菌叢における Firmicutes と Bacteroidetes の比率

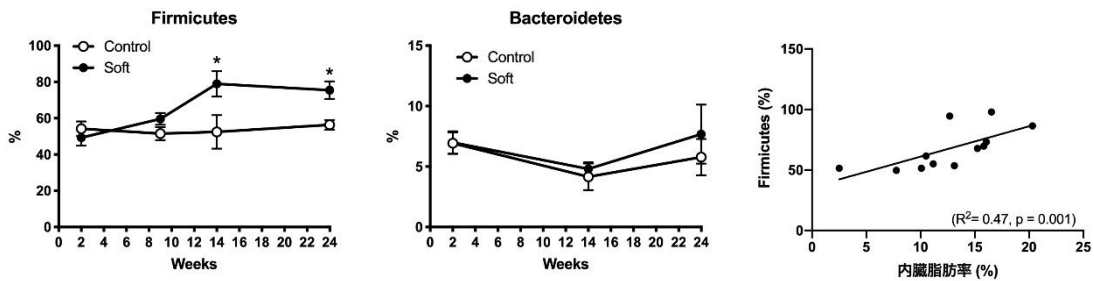


図9. 腸内細菌叢における Firmicutes と Bacteroidetes の比率

文献

- 1) Bae CR, Hasegawa K, Akieda-Asai S, Kawasaki Y, Senba K, Cha YS and Y, Date Y: Possible involvement of food texture in insulin resistance and energy metabolism in male rats. J Endocrinol 222: 61-72, 2014.
- 2) Bae CR, Hasegawa K, Akieda-Asai S, Kawasaki Y, Cha YS, Date Y: The short-term effects of soft pellets on lipogenesis and insulin sensitivity in rats. Prev Nutr Food Sci. 19:164-9, 2014.
- 3) 伊藤学而編著, 黒江和斗, 永田順子, 梶原和美著: カウンセリングで治す顎関節症者: 医歯薬出版, 東京, 全 129 頁, 2004.
- 4) 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン 改訂第2版. 日本歯周病学会編, 2016.
- 5) 歯周病と全身の健康. 日本歯周病学会編, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Han Wanxin, Utoyoma Maiko, Akieda-Asai Sayaka, Hidaka Ayano, Yamada Chihiro, Hasegawa Kazuya, Nuno Hiroyuki, Date Yukari	4. 巻 103
2. 論文標題 Influence of food texture on energy metabolism and adiposity in male rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Physiology	6. 最初と最後の頁 1347 ~ 1356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/EP087072	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 Akieda-Asai Sayaka, Ma Hao, Date Yukari	4. 巻 317
2. 論文標題 Palmitic acid induces guanylin gene expression through the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway in rat macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1239 ~ C1246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00081.2019	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 Akieda-Asai Sayaka, Ida Takanori, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Date Yukari	4. 巻 99
2. 論文標題 Interleukin-15 derived from Guanylin β GC-C-expressing macrophages inhibits fatty acid synthase in adipocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 14 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2017.10.012	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 Yasuda Masahiro, Kawabata Jyunya, Akieda-Asai Sayaka, Nasu Tetsuo, Date Yukari	4. 巻 18
2. 論文標題 Guanylyl cyclase C and guanylin reduce fat droplet accumulation in cattle mesenteric adipose tissue	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 341 ~ 341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4142/jvs.2017.18.3.341	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 Horii Yasuyuki, Nakajima Shingo, Akieda-Asai Sayaka, Ohta Ryo, Kawaguchi Maiko	4. 巻 229
2. 論文標題 Maternal traits during lactation period reduce the anxiety-related behavior in male offspring: Results from a fostering study in Hatano rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 113209 ~ 113209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2020.113209	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7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 秋枝さやか, Han Wanxin, 宇藤山麻衣子, 伊達紫:
2. 発表標題 食物の性状が腸内グルコーストランスポーターや腸内微生物に及ぼす影響,
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会, 京都
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

1. 発表者名 宇藤山麻衣子, Han Wanxin, 秋枝さやか, 伊達紫
2. 発表標題 軟食自由摂食ラットにおける内臓脂肪蓄積と摂食調節因子
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会九州支部例会, 宮崎
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

1. 発表者名 Han Wanxin, 秋枝さやか, 宇藤山麻衣子, 伊達紫:
2. 発表標題 Effects of food texture on the expressions of glucose transporters and gut microbiota in rats.
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会九州支部例会, 宮崎
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

1. 発表者名 Akieda-Asai S, Date Y
2. 発表標題 Sex differences in high-fat diet-induced obesity in rats.
3. 学会等名 Gender Summit 10, Satellite Conference, Okinawa, (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 秋枝さやか, 伊達紫
2. 発表標題 農と食の未来を切り拓け！ホルモン研究-「食物の性状が糖代謝や脂質代謝に及ぼす影響」
3. 学会等名 ConBio2017, 神戸, (ワークショップ招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Han W, Utoyama M, Akieda-Asai S, Date Y
2. 発表標題 Influence of food texture on energy metabolism and adiposity in male rats.
3. 学会等名 第23回アディポサイエンス・シンポジウム, 大阪
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 秋枝さやか, 伊達紫
2. 発表標題 軟食摂取による腸内細菌叢の変化
3. 学会等名 第11回ペプチド・ホルモン研究会, オンライン会議
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 永田順子、迫田隅男、温水佳世子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 クインテッセンス出版	5. 総ページ数 136
3. 書名 子どもの口と顎の異常・病変 口の粘膜編,	

1. 著者名 迫田隅男、永田順子、温水佳世子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 クインテッセンス出版	5. 総ページ数 136
3. 書名 子どもの口と顎の異常・病変 口の粘膜編	

〔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	秋枝 さやか (Akieda-Asai Sayaka) (20549076)	宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授 (17601)	
研究分担者	山下 善弘 (Yamashita Yoshihiro) (30254634)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	伊達 紫 (Date Yukari) (70381100)	宮崎大学・ 理事・副学長 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	温水 佳世子 (Nukumizu Kayoko) (20648117)	宮崎大学・医学部・医員 (17601)	

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