

令和 3 年 4 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02157

研究課題名(和文) 糖尿病を前症段階で改善する新たな食機能戦略の構築

研究課題名(英文) Study on the anti-diabetic foods to improve diabetes at pre-diabetes stages

研究代表者

松井 利郎 (Matsui, Toshiro)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20238942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病発症の前症(かくれ)段階で食品成分によってその進行を遮断し、正常域にシフトさせる糖尿病予防食品の提案と前症改善機構の解明を目的として実施した。糖尿病自然発症ラット(SDT)を用いて前症段階での耐糖能異常を改善することができる食品成分として、6-O-カフェオイルキナ酸(CS)、デルフィニジン 3-ルチノシド(D3R)、およびテアフラビン(TF)が有効であることを初めて突き止めた。その作用発現機構として、小腸でのインクレチン分泌促進やprohormone convertase1/3、AMPK活性化を介したエネルギー代謝促進であることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

空腹時血糖値の上昇が糖尿病発症の診断尺度であるが、空腹時血糖値は正常であっても食後の過血糖値の改善が不全である隠れ糖尿病をあぶり出し、改善する食品成分については研究報告例がない。本研究では、この改善作用を発揮する食品成分を明らかにした点で大いに評価され、糖尿病を未病段階で改善できる新たな機能性食品の開発に資する成果を得ているといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate bioactive food compounds showing anti-pre-diabetic effect in vivo and to elucidate the underlying mechanism. Using spontaneously hyperglycemic rats (SDT rats), which possess normal fasting blood glucose level even in pre-diabetic stages, we demonstrated the novel anti-pre-diabetic findings that 6-O-caffeoylquinic acid, Del-3-O-rutinoside, and theaflavins can ameliorate glucose tolerance by promoting incretin secretion and energy consumption via prohormone convertase1/3 and AMPK activation at the small intestine.

研究分野：食品機能学

キーワード：糖尿病前症 糖尿病予防 ポリフェノール エネルギー代謝 インクレチン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は血糖値が上昇し、重篤な合併症を誘発する恐れがある循環器系疾患であるが、その発症には糖尿病前症期（空腹時の血糖値 BGL は正常である一方で、糖負荷試験での 2 時間後 BGL 値が高値）が大きく関わる。糖尿病前症は糖尿病進展のリスク要因であることから、前症期での改善が強く望まれている。しかしながら、前症期を判定するには、糖質負荷試験（OGTT）による耐糖能評価に委ねられているのが現状である。我々は、これまでにグルコースからの糖化反応生成物である終末糖化産物（Advanced Glycation End-product, AGE）に着目し、血中でのタンパク質結合型 MG-H1 が糖尿病前症を反映する指標物質となりうることを報告してきた。また、これまでの研究によって、糖尿病自然発症ラットである spontaneously diabetes Torii (SDT) ラットは長期間（12 週齢から 8 週間程度以上）前症期が持続することを明らかにし、糖尿病前症期に対する食品成分の改善作用を評価するための適切な動物系モデルであることを報告してきた。そこで、本研究では SDT ラットを用いて、前症段階での改善作用を示す新たな食品成分の究明とその作用機構について検討を行った。

2. 研究の目的

- 1) 食品成分は糖尿病発症を予防するのか、糖尿病を改善するのかを明示
- 2) 糖尿病前症を改善する新たな食品成分の発見と作用機能の解明
- 3) エネルギー代謝を促進することによる糖代謝正常化（糖尿病予防）を可能とする食品成分の発見と作用機構の解明

3. 研究方法

- 1) 紫カンショ (*Ipomoea batatas* L. cv. Ayamurasaki、品種アヤムラサキ) の酢酸発酵酢である紅酢 (RV) を対象とした。本 RV には 6-O-caffeoylsophorose (CS) を 27% 含んでいる。SDT ラットに対する長期投与試験は、11 週齢からの投与あるいは 15 週齢か 26 週齢からの投与を実施した (4.3 mg/kg/day)。各投与試験群ともに、体重、摂食量を毎週測定した。また、毎週、16 時間絶食後に尾静脈採血し、空腹時 BGL 並びに得られた血漿についてインスリン量を測定した。OGTT 試験 (グルコース 2 g/kg) 並びに血中 AGE 量の測定は、TNBS 誘導体化 LC-MS/MS 法により実施した。測定対象 AGE は、Glyoxal-derived hydroimidazolone (G-H1)、methylglyoxal-derived hydroimidazolone (MG-H1)、N^ε-carboxymethyl-ε lysine (CML)、N-(1-carboxyethyl)-lysine (CEL) および argpyrimidine (AP) である (内標準物質: MG-H1-d3 および CEL-d4)。
- 2) テアフラビン (TF) 投与試験については、TF 及び TF mono/di-gallate を含む TF 混合粉末を 0.5%CMC 溶液に溶解し、25 mg/kg/day 投与した。SDT ラットに対する投与開始は 9 週齢から 28 週齢まで実施した。投与試験終了後、直ちに関連臓器 (空腸、膵臓、門

脈欠及び循環血)を摘出し、各種試験に使用した。なお、インクレチン (GIP、GLP-1) 量は、ELISA 法 (GIP: YK251, Yanaihar Institute Co.; GLP-1: 299-7550, Fujifilm Wako Shibayagi Co.) により測定した。小腸におけるグルコース輸送体 (GLUT2 および SGLT1) の発現量についてはキャピラリー電気泳動イムノアッセイ法 (Wes 法、本研究での新規購入装置) で実施した。DPP-4 活性は DPP-IV/CD26 assay kit (BML-P189-9091, Enzo Inc.)を用いて門脈血での酵素活性を求めた (mmol/min)。その他の試験項目は 1)と同様である。

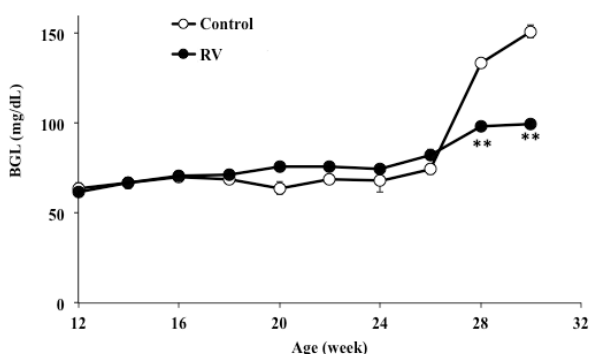
- 3) 細胞質増加による H & E 染色量の増大と抗 UPC1 抗体を用いた免疫組織染色によってマウスでの褐色脂肪細胞化によるエネルギー代謝の亢進作用を評価した。当該作用候補成分として、プロポリス由来のアルテピリン C (とクルクミン) を用いた。

4. 研究成果

1) 食品成分は糖尿病発症を予防するのか、糖尿病を改善するのか

糖尿病前症発症前の段階である正常期 (11 週齢 SDT ラット) からの RV 投与を実施し、RV の糖尿病発症予防作用を評価した (図 1)。その結果、26 週齢まで 14 週間の投与期間中、空腹時 BGL は RV 投与群とコントロール群の間に有意差は認められず、110 mg/dL 以下の正常値範囲を推移した。それに対して、コントロール群では 28 週齢以降に急激に空腹時 BGL が上昇し、28 週齢で 134 ± 13 mg/dL に達したことから、SDT ラットは糖尿病初期発症段階であると判断された。他方、RV 投与群では明らかに ($P < 0.01$) 空腹時 BGL の上昇が抑制され、28 週齢においても 100 mg/dL 以下 ($99 \pm 20 \text{ mg/dL}$) であった。これらの結果は、“正常期”からの RV (あるいは紅酢) の摂取は糖尿病発症の予防に有効であることを示す初めての知見といえる。また、16、20 週齢時において OGTT 試験での AUC 量は RV 摂取群で有意に低く、28 週齢においても同様の傾向が認められたことから、RV は糖尿病前症期段階から耐糖能異常の進展を抑制していることが示唆された。また、20 週齢時の血漿タンパク質結合型 MG-H1 量は RV 投与群において有意に ($P < 0.05$) 低値を示した (コントロール群: 128.4 ± 8.1 pmol/mg protein, RV 群: 69.4 ± 6.1 pmol/mg protein)。血漿タンパク質結合型 MG-H1 は糖尿病前症期の発症を判断可能な指標 AGE 代謝物であることから、RV は前症期段階で糖尿病の進展を抑制していることを強く示唆するものであった。また、RV 群での 28 週齢時 (糖尿病発症期) での遊離型 MG-H1 ならび CML 量の有意な低下が認められ、RV が AGE 産生の抑制を介して糖尿病の発症を予防していることが明らかとなった。

図 1 糖尿病前症発症前からの RV 投与試験



糖尿病前症発症期（16 週齢 SDT ラット）からの RV 投与を実施し、RV の糖尿病発症予防作用を評価した。その結果、RV 投与群は 32 週齢まで明らかに空腹時 BGL はコントロール群と比べて低値であった。この結果は、正常期だけでなく（図 1）、“糖尿病前症期”からの RV の摂取開始であっても糖尿病発症の予防が十分に可能であることを示唆する初めての知見であった。しかしながら、糖尿病発症した 32 週齢では、空腹時 BGL は RV 投与群においてコントロール群と比べて有意に ($P < 0.01$) 低いものの、すでに糖尿病と診断される BGL 値に到達していた（コントロール群, 314 ± 36 mg/dL; RV 投与群, 202 ± 24 mg/dL）。このことは、前症期からの RV 摂取は糖尿病の進展と疾病の程度を低減することはできるが、発症そのものを予防することは困難であることを示唆している。

次いで、糖尿病発症期（27 週齢 SDT ラット）からの RV 投与を実施し、RV の糖尿病改善作用を評価した。その結果、32 週齢まで 5 週間の投与期間中、空腹時 BGL は RV 投与群とコントロール群の間に有意差は認められず、糖尿病改善作用は認められなかった（32 週齢：コントロール群, 224 ± 30 mg/dL; RV 投与群, 254 ± 31 mg/dL）。これらの結果は、“糖尿病発症期”からの RV の摂取では糖尿病の改善効果は期待できないことを示唆している。この結果は、HOMA-IR 値、膵臓インスリン分泌量に関して両群間に有意差が認められなかった結果とも一致するものであった。

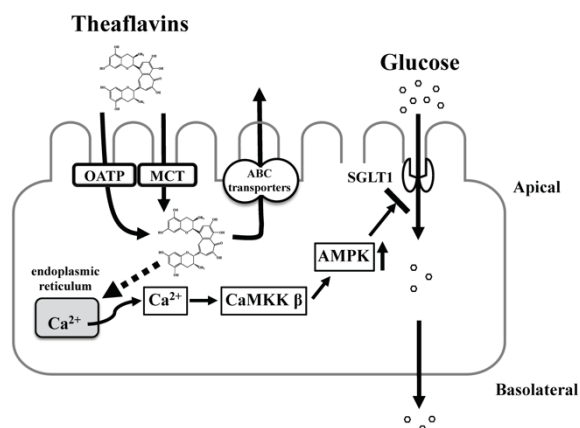
2) 糖尿病前症を改善する（耐糖能異常を改善する）新たな食品成分の発見と作用機能

1)と同様に、SDT ラットを用いてテアフラビン (TF: 25 mg/kg/day) の長期投与試験を実施した。その結果、コントロール群では 20 週齢以降での糖尿病進行に伴う体重減少や空腹時 BGL の上昇 (139 ± 23 mg/dL) が認められたのに対して、TF 投与群では全くそのような異常性は認められず、BGL も 28 週齢時において 74 ± 11 mg/dL と正常範囲であった。糖尿病前症後期段階である 22 および 24 週齢において OGTT 試験を実施した結果、明らかな耐糖能異常の改善が認められ、TF は糖尿病を前症の段階で予防できる新たな生理活性成分であることが初めて本研究で明らかにすることができた。また、血中インスリン量も同様に TF 投与群で高値となったことから、TF 摂取は SDT ラットで起こる膵臓でのインスリン産生低下を抑制し、結果としてインスリン抵抗性を改善する作用を有していると考えられた。

TF 摂取で認められた耐糖能異常並びにインスリン抵抗性の改善作用について、さらなる究明を図った。TF 投与試験終了後（28 週齢 SDT ラット）、グルコース吸収の場である小腸について、関連タンパク質発現量について Wes 法による検討を行った。これまで、TF は腸管吸収されない食品成分（MCT/OATP 経路による取り込みと ABC 系による排出）であるにもかかわらず、小腸膜バリアを向上させること、さらにはペプチド輸送担体である PepT1 発現量を抑制するなど、小腸膜に対して何らかの生理作用を発現する機能体であることを明らかにしている。そこで、まず Caco-2 細胞を用いて、TF がグルコース輸送担体の発現に及ぼす影響について検討を行った。TF-3'-*O*-gallate を用いて作用機構を検討した結果、TF は小胞体からの Ca イオン放出を介して AMPK を活性化し、SGLT1 発現を抑制（グルコース

透過を抑制) することを明らかにした (図 2)。

この知見に基づき、TF 群での SDT ラットでの糖尿病前症予防効果について、糖取り込み



み輸送系発現量を Wes 法で評価した。その結果、細胞試験で得られた SGLT1 発現量の急性低下作用は *in vivo* 長期投与試験では認められなかった。他方、インクレチン量を測定したところ、TF 投与群では、GIP および GLP-1 とともに有意な増大が認められた。インクレチン分泌量に負の影響を及ぼす DPP-4 活性には両群間で差は認められなかった。

図 2 テアフラビンによる Caco-2 細胞での糖取り込み経路の遮断機構

以上のことから、テアフラビンは CS と同様に、糖尿病を前症の段階で改善・予防できる新規機能性食品成分であることを初めて明らかにすることができた。

3) 褐色脂肪細胞化の誘導作用によるエネルギー代謝の亢進作用

多用な食品成分を検証し、褐色脂肪細胞化の視点から機構解明を行った。褐色脂肪細胞化誘導作用とこの時の脂肪組織温度の直接計測の結果、プロポリス由来成分の一つであるアルテピリン C のマウスへの投与によって褐色脂肪細胞化が誘導された鼠径部白色脂肪組織 (iWAT) のみ熱産生 (組織温上昇) が起こり、熱産生が促進されること、クレアチン経路阻害剤 (b-GPA) を用いた試験により、熱産生作用機構が UCPI に非依存的なクレアチン経路を介することを明らかにした。さらに、抗糖尿病前症成分を併用する (アルテピリン C とクルクミン) することで、低用量の投与により褐色脂肪細胞化の誘導が実現できること、この作用が M2 マクロファージの集積と、この集積 M2 マクロファージからの局所的なノルエピネフリン産生によるものであるとの知見を得ている。これらの作用はいずれも糖尿病前症改善作用に資するもので、糖尿病前症改善機構の説明となり得るものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nguyen Huu-Nghi, Tanaka Mitsuru, Li Baorui, Ueno Tomoya, Matsuda Hideki, Matsui Toshiro | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Novel in situ visualisation of rat intestinal absorption of polyphenols via matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 3166-3173 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39405-w | 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 Nectoux Alexia M., Abe Chizumi, Huang Shu-Wei, Ohno Naoto, Tabata Junji, Miyata Yuji, Tanaka Kazunari, Tanaka Takashi, Yamamura Haruo, Matsui Toshiro | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Absorption and Metabolic Behavior of Hesperidin (Rutinosylated Hesperetin) after Single Oral Administration to Sprague-Dawley Rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry | 6. 最初と最後の頁 9812 ~ 9819 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.9b03594 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nishikawa Sho, Hydo Takuma, Aoyama Hiroki, Miyata Ryo, Kumazawa Shigenori, Tsuda Takanori | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Artepillin C, a Key Component of Brazilian Propolis, Induces Thermogenesis in Inguinal White Adipose Tissue of Mice through a Creatine-Metabolism-Related Thermogenic Pathway | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry | 6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1014 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.9b07080 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 NISHIKAWA Sho, KAMIYA Misa, AOYAMA Hiroki, YOSHIMURA Kazuki, MIYATA Ryo, KUMAZAWA Shigenori, TSUDA Takanori | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Co-Administration of Curcumin and Artepillin C Induces Development of Brown-Like Adipocytes in Association with Local Norepinephrine Production by Alternatively Activated Macrophages in Mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology | 6. 最初と最後の頁 328 ~ 334 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.65.328 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takao Kazuhiro, Morishita Naoki, Terahara Norihiko, Fukui Keiichi, Matsui Toshiro | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Anti-diabetic Effect of Acetic Acid-Free Red Vinegar in Spontaneously Diabetic Torii Rats | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi | 6. 最初と最後の頁 552 ~ 558 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/nskkk.65.552 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 IIZUKA Yuzuru, OZEKI Aoi, TANI Tsubasa, TSUDA Takanori | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Blackcurrant Extract Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetic Mice in Association with Increased Basal Secretion of Glucagon-Like Peptide-1 and Activation of AMP-Activated Protein Kinase | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology | 6. 最初と最後の頁 258 ~ 264 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.64.258 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nishikawa Sho, Hyodo Takuma, Nagao Tsubasa, Nakanishi Akihito, Tandia Mahamadou, Tsuda Takanori | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 -Monoglucosyl Hesperidin but Not Hesperidin Induces Brown-Like Adipocyte Formation and Suppresses White Adipose Tissue Accumulation in Mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry | 6. 最初と最後の頁 1948 ~ 1954 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b06647 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 小島拓也、加藤大樹、西川翔、津田孝範 |
| 2. 発表標題 食品由来因子と運動の併用による褐色脂肪細胞化の誘導 |
| 3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 津田孝範 |
| 2. 発表標題 Curcumin as a functional food-derived factor: Curcumin as a functional dietary factor: Curcumin induces brown-like adipocyte formation in mice |
| 3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sho Nishikawa, Takuma Hyodo, Hiroki Aoyama, Ryo Miyata, Shigenori Kumazawa, Takanori Tsuda |
| 2. 発表標題 Artepillin C induces thermogenesis in inguinal white adipose tissues of mice in association with a creatine metabolism-related thermogenic pathway |
| 3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 松井利郎 |
| 2. 発表標題 食品成分の腸管吸収動態 |
| 3. 学会等名 第25回日本食品化学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 李 宝瑞、小島瑠知亜、山本彩香、上野智也、松井利郎 |
| 2. 発表標題 Theflavin-3-O-galltae inhibits glucose transport in Caco-2 cells by downregulating the expression of GLUT-2 via AMPK signaling pathway activation |
| 3. 学会等名 第66回日本食品科学工学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高尾和宏、森下尚紀、寺原典彦、福井敬一、松井利郎 |
| 2. 発表標題 SDTラットを用いた紫甘藷発酵紅酢の項尿病身点予防作用の検証 |
| 3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小島瑠知亜、吉田理紗、Sato Ritsuko、森下尚紀、品川雅敏、落合孝次、松井利郎 |
| 2. 発表標題 骨格筋L6細胞におけるプレニル化ダイゼインのグルコース取り込み作用 |
| 3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 飯塚 讓、尾関 葵、西川 翔、谷 翼、津田 孝範 |
| 2. 発表標題 ブラックカラント果実抽出物の耐糖能改善作用と作用機構の解明 |
| 3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 青山 広樹、兵頭 拓真、神谷 美沙、西川 翔、宮田 涼、吉村 一輝、熊澤 茂則、津田 孝範 |
| 2. 発表標題 プロポリス成分による褐色脂肪細胞化と組織温度上昇機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

食品分析学HP
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/biosci-biotech/bunseki/>

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 | 津田 孝範 (Tsuda Takanori) (90281568) | 中部大学・応用生物学部・教授 (33910) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|