

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K02252

研究課題名(和文) II型糖尿病初期予防のためのビタミンEおよび摂取油脂に関する研究

研究課題名(英文) Effect of Vitamin E and fat intake for prevention of early stage of type II diabetes

研究代表者

藤原 葉子 (Fujiwara, Yoko)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：50293105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食摂取が続き肥満になると、膵細胞は増殖、肥大化してインスリン分泌量を増加し、上昇する血糖値を下げようとするが、その能力が破綻し、インスリンを分泌することができなくなることが、糖尿病の発症につながると考えられている。この膵細胞の増殖が、高脂肪食摂取後3日という初期に起きていることが報告されたことから、本研究では、このような極めて初期段階での膵細胞の応答に対して、影響を与える食事因子として、ビタミンEやポリフェノール、脂質の種類の効果について検討した。ビタミンEの影響は認められなかったが、抗肥満作用を持つポリフェノールや、脂質の種類によって細胞の増殖増大に影響を持つ可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満に起因する生活習慣病の中でも糖尿病患者は増加しており重要な課題となっている。しかし食生活によって糖尿病の予防や発症を遅らせることは可能である。血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンは膵臓細胞から分泌されるため、細胞の数や機能維持は糖尿病予防に重要なターゲットである。本研究は、高脂肪食摂取後の体重や血糖値、血中インスリン濃度に変化が見られない、極めて初期段階の膵臓細胞増殖作用と、それを制御可能な食品因子の探索を試みた。本研究は、栄養学的観点から高脂肪食摂取初期の細胞の応答を食事の影響を示したものであり、糖尿病予防において脂肪摂取時の食指導の一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic beta cells proliferate and hypertrophy to increase insulin secretion and lower rising blood glucose levels, but their ability to do so is thought to fail, leading to the onset of diabetes. As this proliferation of pancreatic beta cells was reported to occur as early as three days after feeding a high-fat diet, the present study investigated the effects of vitamin E, polyphenols and types of lipids as influential dietary factors on the response of pancreatic beta cells at this very early stage. No effect of vitamin E was found, but polyphenols with anti-obesity properties and types of lipids were shown to have the potential to influence increased β -cell proliferation.

研究分野：栄養化学 脂質栄養学

キーワード：高脂肪食摂取 糖尿病 膵細胞 インスリン ビタミンE ポリフェノール トコトリエノール

1. 研究開始当初の背景

高脂肪食 (HFD) や肥満により血糖値が高くなると、膵臓はβ細胞の増殖・肥大を誘発し、インスリン分泌量を増加するが、この状態が長期間続くと膵機能が疲弊・破綻し、最終的にインスリン分泌不全となることで、II型糖尿病が発症すると考えられている。我々はこれまでに、HFD摂取マウスを長期間飼育して、耐糖能異常を誘発したマウスにおいて、ビタミンEの同族体であるトコトリエノール (T3) を投与すると、インスリン分泌能が維持されること、またその時に膵臓β細胞の増殖能が維持されていることを見出し、その機能の詳細について検討している。一方で、マウスの膵β細胞の増殖は、HFD摂取3日という極めて初期の段階で、インスリン分泌能の変化やインスリン抵抗性が認められる以前に起きていることがMosserらにより初めて報告された¹⁾。しかし、このようなHFD摂取後短期に誘導されるβ細胞の増殖についての知見や原因は不明であった。

2. 研究の目的

膵β細胞は血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンを分泌する。膵β細胞の増殖は胎児期や膵管結索時に亢進するが、通常の成体における増殖能は小腸のように高くはない。肥満やHFDのような生活習慣に起因するII型糖尿病では、β細胞数とその機能の維持がその発症や進展に大きくかわることから、β細胞の増殖によるインスリン分泌量の増加や機能維持の解明は、食生活による生活習慣病予防や発症遅延に重要である。HFDによる膵β細胞の影響が極めて初期に見られることは、生体にとっての代替作用としての意義だけでなく、我々の食生活において、偏った食生活をどの程度続けると健康へ影響を及ぼすのかを知る上でも重要な知見である。HFD長期投与 (18週以上) のT3による膵β細胞の増殖率増加作用およびそのメカニズムも未明である。そこで本研究ではまず、T3の増殖作用が摂食開始から極めて短期に起きているのかを検証し、T3の膵β細胞増殖に及ぼす影響を調べることを目的とする。また、HFDによるこの初期の応答の原因を探るため、HFDの油脂源として一般的に用いられているラード以外の油を使った場合の影響、および血糖値低下作用が知られているポリフェノールについてもβ細胞に影響を与えるのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食摂取初期におけるマウス膵β細胞増殖と食事因子の影響

57BL/6J雄マウスを市販の固形飼料CE2で7日間の馴化飼育した後に群分けし、普通食 (Normal Diet, ND; 脂質エネルギー比9%) と高脂肪食 (High Fat Diet, HFD; 脂質エネルギー比60%) で3日間飼育した。実験に応じて、HFDやビタミンE同族体、および油脂の種類など食餌組成や実験条件を変えて行ったが、一部を除き、マウスの実験食開始は8週齢時に行った。

採血後の血漿、膵臓、肝臓、精巣及び腎臓周囲白色脂肪組織を採取した。膵臓は4% Paraformaldehyde/PBSで固定しパラフィン包埋した。5μMに薄切した膵臓組織切片を用いて、加熱処理による抗原賦活化を行った後、増殖マーカーとしてKi67抗体、β細胞マーカーとしてインスリン抗体を使った免疫組織化学的手法、アポトーシスはTUNEL染色で評価した。染色した組織はKEYENCE, BX-X700にて顕微鏡観察し、組織切片の膵島数、膵臓β細胞数 (インスリン発現部位のDAPI染色による細胞核数)、およびKi67陽性β細胞数をカウントし、膵臓切片の面積もBX-X700ソフトで解析した。

血糖値は簡易血糖測定器、血漿中のインスリン濃度はELISA法で、その他関連遺伝子の発現量は定量RT-PCR法で測定した。

(2) 培養細胞を用いたビタミンE同族体の膵臓β細胞に対する影響

ヒト膵管由来PANC-1細胞およびそのインスリン分泌能を持つヒト膵β細胞セルラインである1.1B4細胞を用いた。10% FBSを含むRPMI1640培地で培養し、生体内で主要なビタミンE効力を持つαトコフェロール (αToc)、およびT3添加時の細胞増殖、分化および小胞体ストレスに対する影響を、関連遺伝子のmRNA発現量を定量RT-PCRで、タンパク質発現量をWestern blotting法で検討した。

4. 研究成果

(1) HFD摂取初期におけるマウス膵β細胞増殖と食事因子の影響

① HFD摂食による膵β細胞の増殖と評価法とビタミンE同族体の影響

まず、マウスにHFD (日本クレアHFD32) を0, 3および7日間摂食させ、膵β細胞のKi67による増殖能を検討した。Mosserらは8週齢時に実験を開始していたが、今回は、実験開始前にビタミンE欠乏状態にすることを想定して12週齢で行った。マウスにおいても既報と同様に3日

後が最も高くなった(図1)。そこで次に3日間の食餌による違いを検討するために、マウスをND群(市販通常固形食CE2)とHFD群(HFD32)に分けて実験を行った。HFDでは摂食量は減少したが実験期間中の摂食エネルギー量は両群で変わらなかった。体重、血糖値、肝臓重量には差が認められなかったが、精巣周囲脂肪重量はHFD3日間の摂食で有意に増加した。このときの膵臓のKi67陽性/インスリン陽性細胞の割合は、NFの1.21%に対してHFDでは3.11%と有意に高く、HFDによるβ細胞の増殖が亢進していることがわかった。

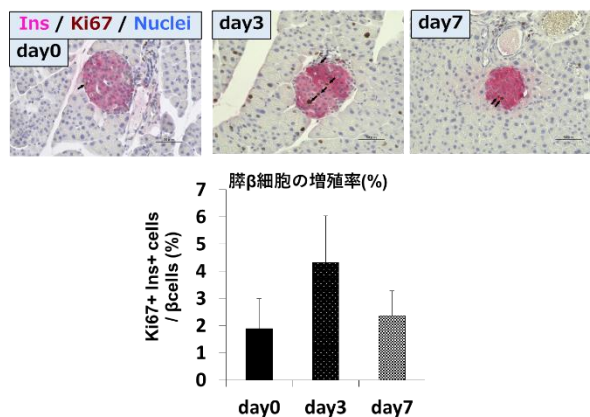


図1 インスリンとKi67による免疫染色によるHFD摂取後の膵β細胞の増殖評価

この増殖率は、これまで本研究室においてHFDの長期間投与実験で得ていた増殖率0.4~1%程度と比べて高かった。以上よりマウス週齢の違いはあるが、既報のとおりHFDでは摂取後3日という極めて早い段階で、膵臓β細胞の応答を確認できた。

次にビタミンE同族体の影響を検討した。ビタミンEの種類による差を調べるため、HFD投与の前に、4週間のビタミンE欠乏食を投与した後、AIN93を基準としたND(E(-)), HFD(E(-)), HFD-Toc(HFDにαトコフェロールを0.08%添加)、HFD-T3(HFDにT3を0.08%添加)の4種の餌で3日間飼育した。摂食量はHFDの3群でNDよりも少なかったが、総摂食エネルギー量には差は見られなかった。しかし予想に反して、HFDの3群とも膵β細胞の増殖率は1%程度で、ND(E(-))の増殖率と変わらず、ビタミンEの有無や種類による差も認められなかった。試験前にビタミンE欠乏状態で予備飼育をすると、生体内での酸化ストレスにさらされ、HFDに替えても膵島の適応能力がなくなっている可能性が考えられた。E欠乏食での前飼育を2週間に短縮したり、食餌組成と実験条件を変えるなど種々な検討を行ったが、市販のHFD(日本クレアHFD32)では増殖率が增加するのに対し、AIN93を基準にして作成したNDとHFDでは明確な増殖率の増加を認めることができなかった。

そこで、ビタミンE同族体の影響、すなわちαTocとT3の影響を比較検討するために、膵β細胞の増殖誘導にはHFD32を用いて、ビタミンEフリーのコーンオイルと、これにαTocあるいはT3を混ぜたものを毎日経口投与し3日間飼育することとした。3日間の飼育では4群間で摂食エネルギー量、体重、肝臓重量に差は認められなかった。

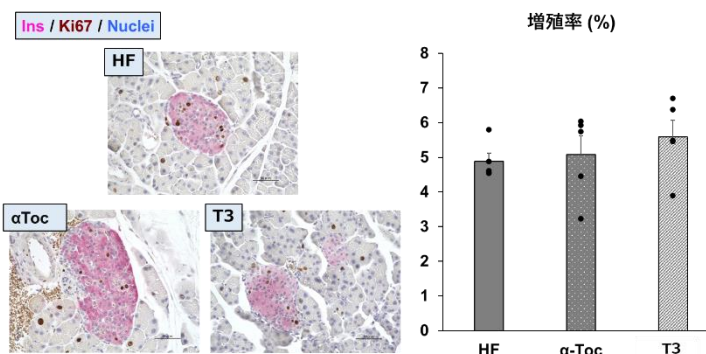


図2 ビタミン同族体のHFD誘導性膵β細胞の増殖に対する影響

血糖値、血漿インスリン濃度にも差はなかったが、精巣および腎周囲白色脂肪組織の重量は、NFと比較してHFDビタミンE欠では有意に高かった。膵β細胞の増殖率は5%程度で、ビタミンEの有無や種類による違いは見られなかった(図2)。膵島あたりのβ細胞数には差がなかったが、細胞の平均面積はT3投与群で有意に小さく、膵島の大きさと数の分布を解析したところ、T3群で小型の膵島数が多い傾向がみられた(図3)。これは本研究室で長期間のHFD摂取で得られた結果と一致した結果であった。TUNEL染色によるアポトーシスは検出できなかった。また、細胞増殖関連遺伝子であるcyclinA2およびcyclinB1の発現量はNFと比較してHFDで有意増加したが、アポトーシス関連遺伝子capase3, caspase 8およびBcl-2、β細胞への分化マーカーであるPDX-1およびNkx6.1、さらに酸化ストレス関連遺伝子であるCatalaseとGpx1、小胞体ストレスについてはCHOPとxBP1も差は見られなかった。ビタミンE同族体による影響も認められなかった。

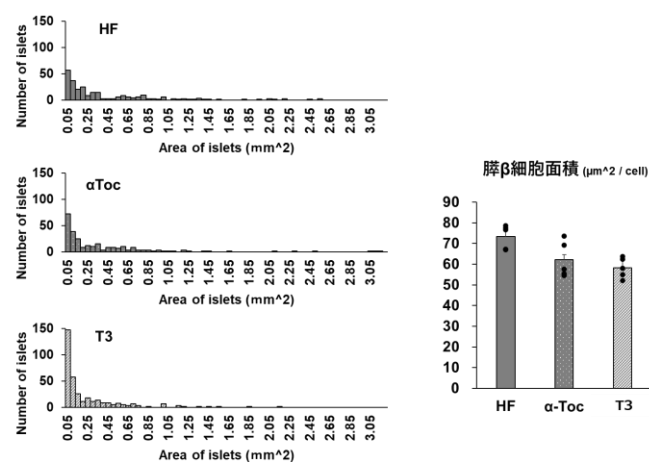


図3 膵島の数と大きさの分布とビタミンEの影響

②Piceatannol(Pic)のHFD摂取初期における膵β細胞に対する影響

本研究室では、HFD 摂食時に抗肥満作用を持つポリフェノールの一つである Pic が空腹時血糖値を低下するという知見を持っているため³⁾、Pic についても 3 日間の HFD 投与初期において膵β細胞に作用を及ぼす可能性があるのかを検討した。HFD コントロールと、HFD に 0.25%の Pic を添加した餌で飼育し、3 日後に膵β細胞増殖能を調べた。Pic 添加群では無添加の HFD より体重、精巢および腎周囲白色脂肪組織重量が低く、膵β細胞の増殖率も低くなった(図4)。長期 HFD に Pic を 12 週摂取時添加したときには、Pic 投与群では顕著に脂肪蓄積が抑制されていたが、膵β細胞の増殖能には差は認められなかった。

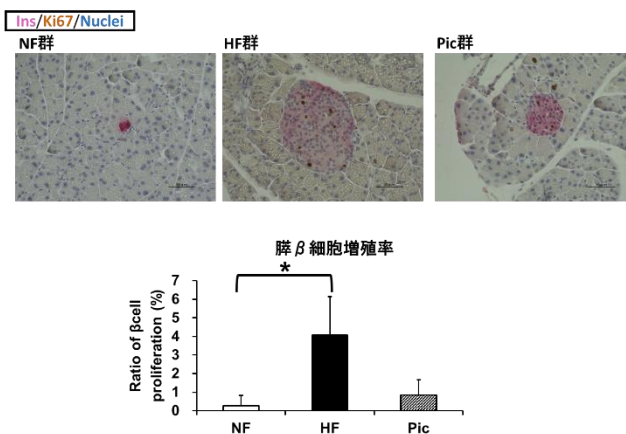


図4 PicによるHFD摂取後の膵β細胞の増殖に対する影響

③HFD 摂取による膵β細胞増殖に与える油脂の種類による影響

HFD 短期投与で誘導される膵β細胞の増殖の原因は不明である。脂肪の摂取は量だけでなく質が重要であることから、HFD の油脂源を脂肪酸組成の異なるラード(飽和脂肪酸)、パーム油(植物由来であるが飽和脂肪酸を含む)および大豆油(リノール酸や多価不飽和脂肪酸を多く含む)を使って検討したところ、パーム油でβ細胞の増殖率が高い傾向が認められた(図5)。パーム油を 60%含む長期 HFD 飼育すると、血中インスリン量が高く、糖負荷後の血糖値低下が速やかに起きることが報告されている。長期パーム油摂取による作用機序も不明であるが、HFD 投与初期からβ細胞の増殖や肥大に関わっている可能性が示唆された。

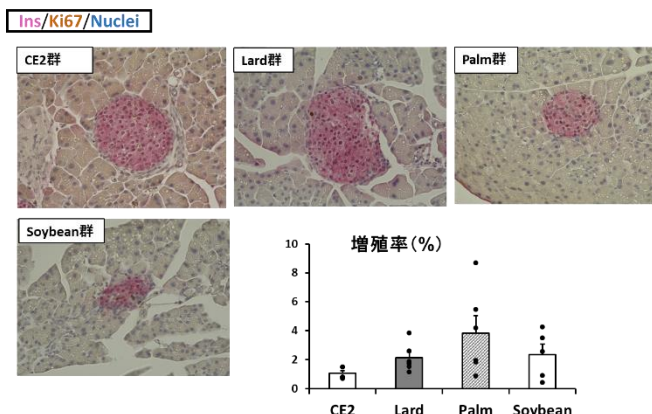


図5 HFDの油脂源の違いによるβ細胞増殖に及ぼす影響

(2)培養細胞系におけるビタミンE同族体の膵β細胞増殖に及ぼす影響

マウスを使った *in vivo* の実験では、ビタミンEによる明確な影響を評価することができなかったため、培養細胞を用いて、ビタミンE同族体の細胞に対する直接的な作用を検討した。β細胞モデルである 1.1B4 を播種し、αToc およびγT3 を添加して培養して経時的に細胞数をカウントしたところ、両者とも細胞増殖を有意に促進した(図6)。T3はαToc よりも細胞に取り込まれやすいことが知られているが、αToc よりも低濃度で細胞増殖を促進した。この結果はMTTアッセイやcyclinD1のmRNA発現レベル上昇からも確認できた。HFDによる作用を想定し、細胞にパルミチン酸を添加し、その細胞毒からの保護作用についても検討した。γT3はパルミチン酸による酸化ストレスや小胞体ストレスを緩和する可能性が示された。PANC-1細胞のβ細胞への分化と分化誘導時に添加したビタミンE同族体の影響を調べたが、分化への影響は認められなかった。

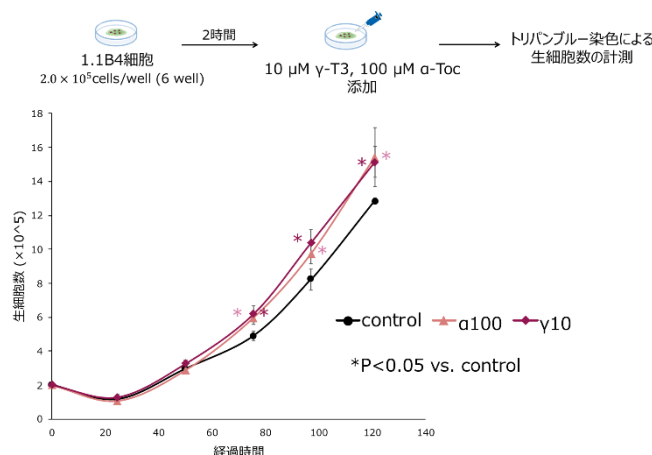


図6 1.1B4細胞の増殖に及ぼすビタミンEの影響

(3)まとめ

今回行った HFD 投与後の初期段階に誘導される膵β細胞増殖作用に対し、ビタミンEおよびその同族体は影響を与えないことがわかった。一方で、細胞レベルではβ細胞の分化ではなく、

自己増殖を促進し、HFD 投与時の酸化ストレスや小胞体ストレスへ関与する可能性が示された。

本研究を通して、HFD 投与後短期での食事因子の影響を評価する問題点が明らかとなった。その一つは HFD で増加する増殖率が 5%程度であり、膨大な組織切片と免疫染色の手間をかけても、その差を数量的に判定することが非常に難しいことがわかった。また、HFD であっても食餌によって β 細胞増殖増加率にはかなり差があり、市販の HFD では高い増殖率が認められるが、栄養学で一般に使用される AIN93 に準じて作成した HFD を AIN93 (NF) と比較すると、市販の HFD ほど高くならなかった。市販の HFD と AIN93 の組成は、油、タンパク質、糖質の種類や含量が少しずつ違っており、現時点ではどれが問題なのかは特定できていない。しかし、体重には現れなくても内臓脂肪の増加が必要であることや、少なくとも脂質 60%というヒトの食生活では想定できないほどの脂肪負荷でなければ β 細胞増殖は起こらず、通常の日本人の食事で考え得る 45~50%脂質エネルギー比の HFD では、摂取後 3 日間での膵 β 細胞の増殖は促進されないようであった。また Mosser らがコントロールとしている ND は市販の通常ペレットであり、これも、市販 HFD とは食餌組成や内容が全く異なるものである。AIN93 を基準に脂肪含量のみを変更した我々の実験がうまくいかなかったことは、食餌中の脂肪量が膵 β 細胞の初期の増殖に重要であることは確かではあるものの、それ以外のタンパク質の量やその種類などその他の要素も関わる可能性を示唆するものである。実際、彼らは短期投与によるメカニズムをメタボローム解析から試みているが、脂質だけでなくアミノ酸も含め、種々複雑な代謝物の変動により、 β 細胞増殖因子を特定することができていない⁴⁾。今後のさらなる研究が必要である。

<引用文献>

- 1) Mosser RE, *et al.* *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308: E573-E582, 2015
- 2) Ikemoto S, *et al.* *Metabolism*, 45:1539-1546, 1996
- 3) Arisawa K, *et al.* *Nutrients* 15:1374-1387, 2023
- 4) Seferovic MD, *et al.* *Am J Physiol Endocrinol Metab* 315: E1251-E1263, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujiwara Y, Ko Y, Sonoda M, Ichi I, Ishikawa T	4. 巻 68
2. 論文標題 Effects of vitamin E and dietary conditions on the differentiation and maturation of osteoclast.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol	6. 最初と最後の頁 73-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.68.73	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 Noichi J, Ishikawa T, Ichi I and Fujiwara Y	4. 巻 70
2. 論文標題 Effect of tocotrienol on the primary progression of nonalcoholic steatohepatitis in a mouse model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 140-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.21-69	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 Hayashi Y, Lee-Okada HY, Nakamura E, Tada N, Yokomizo T, Fujiwara Y and Ichi I	4. 巻 14
2. 論文標題 Ablation of fatty acid desaturase 2 (FADS2) exacerbates hepatic triacylglycerol and cholesterol accumulation in polyunsaturated fatty acid-depleted mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBES Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14134	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 Jikuzono T, Manabe E, Akasu H, Ishikawa T, Fujiwara Y, Makita M, Ishibashi O	4. 巻 15
2. 論文標題 RNA recovery from specimens of duct-washing cytology performed contemporaneously with mammary ductoscopy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-022-05928-1.	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 Jikuzono T, Manabe E, Kure S, Akasu H, Ishikawa T, Fujiwara Y, Makita M, Ishibashi O	4. 巻 14
2. 論文標題 Microarray analysis of ductal carcinoma in situ samples obtained by puncture from surgical resection specimens.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Reseach Note	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-021-05760-z	査読の有無 無
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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 有澤琴子、金子美幸、市育代、藤原葉子
2. 発表標題 高脂肪食摂食時に投与したピセアタンノールが卵巣摘出マウスに及ぼす影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棚谷彩、藤原葉子
2. 発表標題 ファルネソイドX受容体(FXR)機能制御を併せ持つビタミンD誘導体の創製
3. 学会等名 第371回脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原葉子、有澤琴子、金子美幸、小澤菜月、市育代
2. 発表標題 高脂肪食摂食時に投与したピセアタンノールが卵巣摘出マウスに及ぼす影響
3. 学会等名 第14回日本ポリフェノール学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉弘美沙、有澤琴子、石川朋子、市育代、藤原葉子
2. 発表標題 短期間の高脂肪食摂取により生じる膵 細胞増殖と食事因子の影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Moriya Y, Chikamatsu C, Kawawa R, Ishikawa T, Ichi I, Fujiwara Y.
2. 発表標題 The Protective Effects of γ -Tocotrienol on the Pancreas Under Lipotoxic Stress
3. 学会等名 13th Asian Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守屋優香、石川朋子、市育代、藤原葉子
2. 発表標題 In vitroにおける γ -Tocotrienolのヒト膵 細胞に対する影響
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
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	石川 朋子 (Ishikawa Tomoko) (70212850)	聖徳大学・人間栄養学部・教授 (32517)	

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
---------	---------