

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05506

研究課題名(和文)母体の高血糖に起因する新生子のインスリン抵抗性発現をラクトフェリンで改善する

研究課題名(英文)Assessment of lactoferrin for improvement of insulin resistance in the newborn animal induced by their mother's high glycemia

研究代表者

竹内 崇 (Takeuchi, Takashi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20216849

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)：妊娠期から授乳期間を通じて母ラットに高脂肪食を給餌することで母ラットを高血糖状態とし、新生子ラットも離乳時から成育後まで高血糖が持続するモデルを作成した。8週齢で実施した経口耐糖能試験では、高脂肪食群の高血糖は3時間後まで持続したが、ウシラクトフェリン(bLf)を授乳期に投与した群では改善傾向を示した。また、bLf投与によって膵島サイズは顕著に増大し、主に細胞数が増加していた。膵臓のGIP受容体およびGLP-1受容体発現はbLf投与によって促進されていたことから、bLfはインクレチンの応答を改善することで膵臓からのインスリン放出を維持し、糖代謝を改善することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の高血糖は、将来のインスリン抵抗性を伴う糖尿病へ発展するリスクがあり、その危険因子の一つが妊娠期の母親の高血糖であることが報告されています。この研究では、高血糖の母体から出生した新生子ラットを用いて糖代謝異常を改善する新たな方法について検討しました。生後間もない授乳期に鉄結合性糖蛋白であるラクトフェリンを経口投与することで、離乳し成育した後も起こる糖代謝異常が改善される可能性を明らかにしました。その作用メカニズムには、糖代謝に関係するインスリンおよびインクレチンというホルモンの機能をラクトフェリンが増強することが重要であると示唆されました。

研究成果の概要(英文)： We created a model in which the mother rat was hyperglycemia by feeding a high-fat diet (HF) from the pregnancy to the lactation period, and the newborn rat also maintained the hyperglycemia from the weaning to the post-growth period. In an oral glucose tolerance test at 8 weeks of age, hyperglycemia in the HF group persisted until 3 hours later but showed a tendency to improve in the rat which was administered bovine lactoferrin (bLf) during the lactation period. In addition, the pancreas islet size was significantly increased by the bLf administration, as a result of increase in the number of beta-cell. Since pancreatic GIP and GLP-1 receptors expression was promoted by bLf administration, it was suggested that bLf could maintain insulin release from the pancreas and improve glucose metabolism via incretin response.

研究分野：獣医臨床検査学

キーワード：ラクトフェリン インスリン抵抗性 新生子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 2015年時点での我が国における生活習慣病に関連した疾患の患者数は、「高血圧性疾患」が1,010万人超、「糖尿病」が316万人超、「高脂血症」が206万人超、「心疾患」が172万人超、「脳血管疾患」が117万人超となっており、「糖尿病」は「高血圧性疾患」に次いで2番目に患者数の多い国民的疾患である。また、インスリン治療を受けていないが「糖尿病が強く疑われる人」および「糖尿病が否定できない人」はそれぞれ1,000万人に達する。このような現状から、血糖値の上昇を抑えるための食事内容の改善、腸管からの糖吸収を抑制させるサプリメントや人工甘味料が開発されてきた。また、幼児期から学童期のインスリン抵抗性にはレプチンおよびグレリンが大きく関与し、妊娠中に肥満かつ高血糖であった母親から出生した子供のインスリン抵抗性発現の危険因子となり得ることが指摘されている。メタボリックシンドロームは成人の社会問題と考える傾向にあるが、学童期に発現したインスリン抵抗性は生涯にわたって影響を及ぼし続けるため、さらに深刻な社会問題と捉えるべきである。

(2) 申請者らは、牛乳由来のラクトフェリンが肝臓への脂肪蓄積を有意に抑制することを動物実験で証明し(文献①)、他の研究グループは、人においてもラクトフェリンが内臓脂肪の蓄積を抑制することを報告している(文献②)。さらに、申請者らによるこれまでの研究から、ラクトフェリンは成熟ラットの耐糖能試験において血糖上昇を有意に抑制し、その作用機序には血漿インクレチンの上昇に伴う一過性のインスリン放出促進が関与することを報告している(文献③)。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、妊娠ラットに高脂肪食を給餌し、授乳期間ならびに離乳後の新生子にも高脂肪食を給餌することで新生子期から発育期の高血糖状態を誘導し、授乳期の新生子へのラクトフェリン経口投与が成育後の糖代謝異常を改善するか否かを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試験群

実験には妊娠したSDラットを用い、高脂肪食群には出産予定日の10日前から高脂肪食(蛋白質24%、脂肪24%、炭水化物41%含有: D12451, Research Diet Inc., USA)を給餌し、対照群には通常食(蛋白質25.1%、脂肪4.5%、炭水化物49.7%含有: CE-2, 日本クレア、東京)を給餌した。

投薬は新生子ラットに対して行い、生後5日目から21日目まで1日1回、ゾンデを用いて生理食塩水(生食、大塚製薬、東京)または牛ラクトフェリン(bLf, 和光純薬、大阪)300 mg/kgを胃内へ投与した。離乳後には投薬を行わず、授乳期と同様に高脂肪食または通常食を給餌した。

尚、産子数による成育への影響を除外するため、生後1日目に新生子数を1腹あたり10匹に調整し、実験には雄の新生子のみを使用した。

#### (2) 血糖モニタリング

母ラットの血糖値測定は妊娠18日目および出産後21日目(離乳時)に、新生子の血糖値測定は、生後21, 35, 49および63日目に実施した。採血は尾静脈から行い、血糖値の測定は小型電極式グルコース分析装置(アントセンスⅢ、アトムベッツメディカル、京都)によって実施した。

#### (3) 経口耐糖能試験

生後56日目に経口耐糖能試験(OGTT)を実施した。前日から16時間絶食した後に、50%ブドウ糖液(大塚製薬、東京)を2 g/kgの用量でゾンデを用いて胃内投与した。投与前、投与後20, 40, 60, 90および180分に尾静脈から採血し、小型電極式グルコース分析装置によって血糖値を測定した。

#### (4) 血漿の生化学的測定および組織の遺伝子発現解析

生後63日目に、深麻酔下にて心採血を行った後に放血殺し、肝臓、膵臓および白色脂肪(腎臓周囲および精巣周囲)を採取した。血液はヘパリン処理にて血漿を分離し、生化学測定に使用した。臓器の一部はRNAlater solution (Invitrogen, USA)中にて-80℃で保存し、後の遺伝子発現解析に使用した。肝臓と白色脂肪は採取直後に重量を計測した。

血漿インスリン濃度およびレプチン濃度は、いずれもELISA kitを用いて測定した。遺伝子発現解析には、膵臓組織からTotal RNAを抽出し、cDNA合成の後にRealtime PCRによりインスリン、プログルカゴン、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド(GIP)受容体およびグルカゴン様ペプチド1(GLP-1)受容体のmRNA発現を解析した。また、内部標準にはβ-アクチンを使用した。

#### (5) 組織学的解析

肝臓および膵臓は10%リン酸緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定した後、常法にしたがってパラフィン包埋による薄切片を作成した。肝臓標本についてはオイルレッド染色による脂肪滴の蓄積を評価した。また、膵臓標本については抗ラットインスリンまたは抗ラットグルカゴン抗体による免疫染色を行った。標本はデジタル顕微鏡（キーエンス、大阪）にて画像を撮影し、インスリンまたはグルカゴンの陽性細胞数および膵島面積を計測した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新生子の体重、血糖値の推移および臓器重量の比較

生後5日目における高脂肪食群の体重は対照群（生食投与）よりもわずかに低値であったが、生後17日目以降は逆転し、対照群（生食投与）よりもやや増大していた。離乳後もその傾向は持続した。また、通常食給餌であってもbLf投与によって体重は増大する傾向にあった。

母ラットの血糖値は、妊娠18日目および出産後21日目のいずれも高脂肪食群は対照群よりも高値を示した。生後3週目以降の新生子の血糖値は、いずれも高脂肪食給餌によって上昇傾向となり、7週目では有意な上昇が確認された。また、7週目ではbLf投与によって高脂肪給餌の影響は減弱される傾向にあった。

生後63日目で採取した肝臓重量は、対照群（bLf投与）と高脂肪食群（生食投与）において、対照群（生食投与）よりも増加傾向にあった。一方、高脂肪食群（bLf投与）の肝臓重量は対照群（生食投与）と同レベルであった。腎臓周囲と精巣周囲の白色脂肪重量は、いずれも高脂肪食給餌によって有意に増加したが、bLf投与によって改善傾向となった。

#### (2) 経口耐糖能試験

生後56日目に実施した経口耐糖能試験では、ブドウ糖投与前の血糖値は高脂肪食群で有意に高値であったが、投与後40分のピーク値をみると群間に大きな差異はなかった。しかし、投与後180分の血糖値は高脂肪食群（生食投与）においてピーク以降の顕著な高値が持続するのに対し、高脂肪食群（bLf投与）では、40分以降の血糖値はゆるやかに低下し続けた。また、対照群（bLf投与）では、投与後90の時点でピーク値からの早期の回復を認めた。

#### (3) 生化学的解析および遺伝子発現解析

生後63日目の血漿インスリン濃度は、対照群および高脂肪食群のいずれもbLf投与によって有意な上昇が認められた。また、血漿レプチン濃度は、bLf投与に関係なく高脂肪食群では有意な上昇を示した。

膵臓のインスリン mRNA 発現は、高脂肪食群（生食投与）において最も亢進していたが、高脂肪食群（bLf投与）の mRNA 発現は対照群（生食投与）と同レベルであった。尚、対照群（bLf投与）では対照群（生食投与）よりも有意な発現亢進が認められた。膵臓のプログルカゴン mRNA 発現は、高脂肪食給餌による影響はみられず、bLf投与によって有意な発現亢進が確認された。膵臓のGIP受容体 mRNA 発現は、対照群ではbLf投与によって有意に発現が抑制され、高脂肪食群では逆にbLf投与によって有意に発現が亢進された。膵臓のGLP-1受容体 mRNA 発現は、高脂肪食群（bLf投与）においてのみ顕著な発現の亢進が確認された。

#### (4) 組織学的解析

肝臓のオイルレッド染色像を群間で比較すると、対照群ではいずれも肝細胞への脂肪滴の蓄積はわずかであるのに対し、高脂肪食群（生食投与）の肝細胞内には大型の脂肪滴が多数確認された。一方、高脂肪食群（bLf投与）では、肝細胞内に脂肪滴は確認されるものの、大型の脂肪滴はほとんど認められなかった（図1）。

膵臓の抗インスリンならびに抗グルカゴン抗体による免疫染色像を図2に示す。対照群ではbLf投与によって膵島サイズがやや拡大する傾向にあったが、それはインスリン陽性細胞（ $\beta$ 細胞）が主体であった。また、高脂肪食群（生食投与）の膵島サイズと陽性像は対照群（生食投与）とほぼ同様であった。一方、高脂肪食群（bLf投与）では、膵島が顕著に拡大し、その大部分はインスリン陽性細胞であった（図2）。また、膵島あたりのインスリン陽性細胞面積は、bLf投与によって顕著に増大した（図3）。

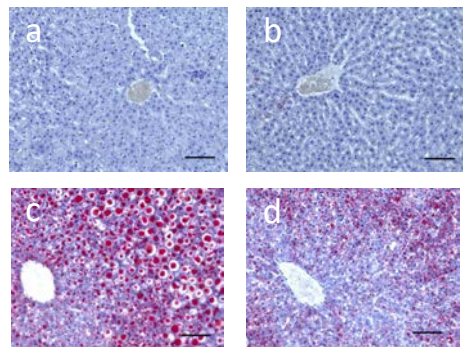


図1 肝臓のオイルレッド染色像  
a:対照群(生食投与)、b:対照群(bLf投与)、c:高脂肪食群(生食投与)、d:高脂肪食群(bLf投与)。Bar=100  $\mu$  m

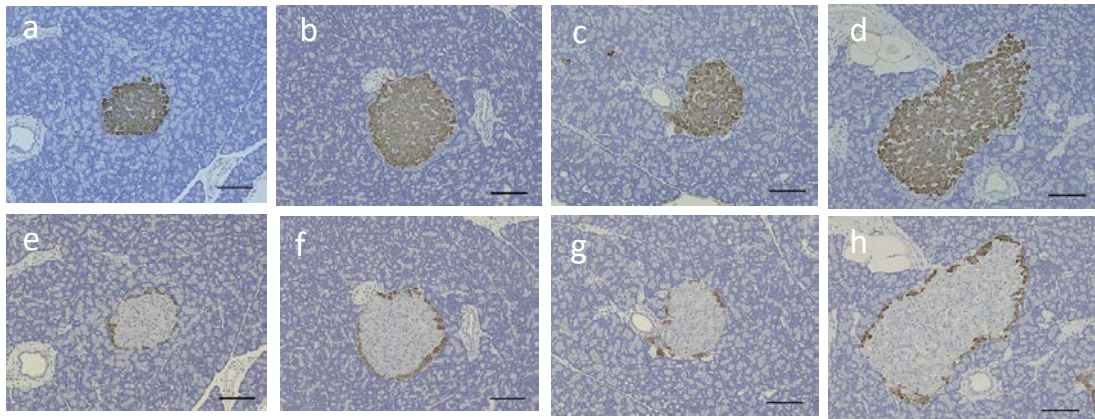


図2 膵臓の免疫染色像

a, e:対照群(生食投与)、b, f:対照群(bLf投与)、c, g:高脂肪食群(生食投与)、d, h:高脂肪食群 (bLf投与)。a~d:抗インスリン抗体陽性像。e~h:抗グルカゴン抗体陽性像。Bar=100  $\mu$  m

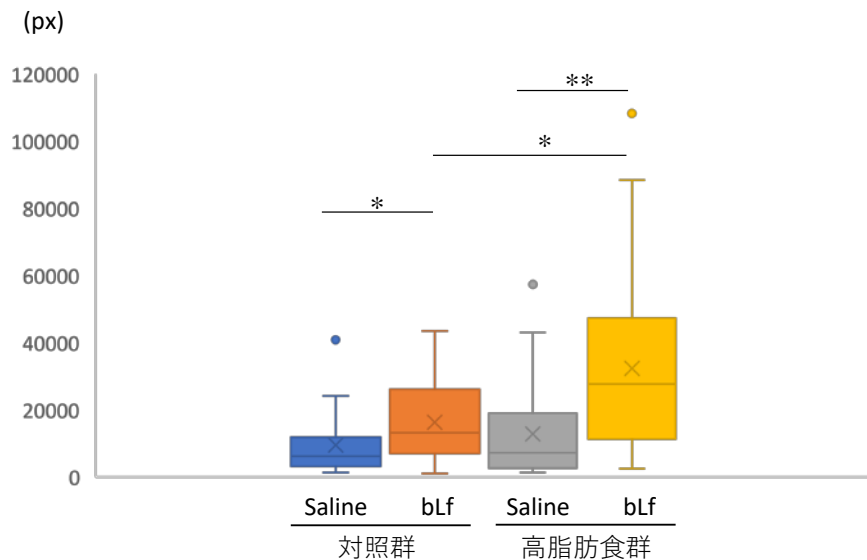


図3 膵島あたりの抗インスリン抗体陽性細胞面積の比較

n=5, 縦軸はピクセルで表示。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

#### (5) まとめ

妊娠期から高脂肪食を給餌することで母ラットの血糖値は上昇し、離乳後も高脂肪食を給餌し続けると新生子の高血糖状態は成育後も持続した。また、白色脂肪の蓄積量が増加するとともに血漿レプチン濃度も有意に上昇した。BLfを授乳期に経口投与することで、膵臓 $\beta$ 細胞の増殖が促進され、血中へのインスリン放出も促進された。経口耐糖能試験においても、授乳期のbLf投与による改善傾向がみられており、さらに肝臓の脂肪蓄積抑制効果と併せて、糖脂質代謝において授乳期のラクトフェリン摂取は長期間にわたって影響し続けることが示唆された。

#### <引用文献>

- ① Takeuchi T, Shimizu H, Ando K, Harada E.: Bovine lactoferrin reduces plasma triacylglycerol and NEFA accompanied by decreased hepatic cholesterol and triacylglycerol contents in rodents. *Br. J. Nutr.*, 91:533-538, 2004.
- ② Ono T, Murakoshi M, Suzuk N, Iida N, Ohdera M, Iigo M, Yoshida T, Sugiyama K, Nishino H. Potent anti-obesity effect of enteric-coated lactoferrin: decrease in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets. *Br. J. Nutr.*, 104: 1688-1695, 2010.
- ③ Maekawa Y, Sugiyama A, Takeuchi T: Lactoferrin potentially facilitates glucose regulation and enhances the incretin effect. *Biochem. Cell Biol.*, 95(1):155-161, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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