

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11060

研究課題名(和文)食餌の性状が糖尿病発症に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of the difference in the property of dietary fed on the development of diabetes mellitus

研究代表者

中村 恭子(Nakamura, Kyoko)

近畿大学・薬学総合研究所・講師

研究者番号：10512197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食後高血糖は食後の血糖値が一過性に急上昇する現象で、空腹時血糖値が正常または境界領域においても生じるため通常の健康診断では見逃される可能性があり、日本で糖尿病患者が増加の一途を辿っている原因の一つではないかと考えている。今までの研究で、2型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスの食後1時間の肝臓を解析した結果、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) シグナル系が食後高血糖の発症に關与する可能性を見出している。そこで4週齢から8週齢の ob/ob マウスの糖尿病発症過程において、食餌の形状が血糖値にもたらす影響を解析し、さらにはその影響に GLP-1 シグナル系が關与するかを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IDF Diabetes Atlas による発表では、日本の2021年における糖尿病人口は1100万人で世界9位の糖尿病大国であるといわれている。また、厚生労働省の平成28年「国民健康・栄養調査」で、糖尿病が強く疑われる者は約1000万人と推計され平成9年以降増加していると発表されている。このように糖尿病患者数は増加の一途を辿っている中、本研究により糖尿病発症に關わる食後高血糖について、マウスの食餌の形状が食後高血糖に与える影響を明らかにすることは、日頃の食事から食後高血糖を防ぎ糖尿病発症を抑える手段の発見に繋がる可能性があり、学術的にも社会的にも意義のある研究成果になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Postprandial hyperglycemia is a transient, rapid rise in blood glucose levels after the meals, which may be missed even when fasting blood glucose levels are normal or in the borderline range. Thus, it is possible that postprandial hyperglycemia can be missed by medical checkup that usually tested fasting blood glucose. We considered that this is one of the reasons why the number of diabetic patients is increasing in Japan. In our previous study, we analysed the liver of ob/ob mice, a mouse model of type 2 diabetes, one hour after a meal and found that the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) signalling pathway may be involved in the mechanism of the development of postprandial hyperglycemia after a meal. Therefore, we analysed the effects of diet shape on blood glucose levels during the development of diabetes in 4 weeks to 8 weeks old ob/ob mice and further investigated whether the GLP-1 signalling pathway is involved in these effects.

研究分野：糖尿病

キーワード：食後高血糖 食餌の形状 GLP-1

1. 研究開始当初の背景

【2型糖尿病における食事の重要性】

厚生労働省の平成28年「国民健康・栄養調査」において、ヘモグロビン A1c (NGSP) 値が6.5%以上、または糖尿病治療をしている者に該当する「糖尿病が強く疑われる者」の糖尿病有病者は約1000万人と推計され、「糖尿病の可能性を否定できない者」の糖尿病予備軍も同様に約1000万人に上ると報告された。特に糖尿病有病者数は年々増加し続けており、糖尿病は日本の国民病と言われるまでになっている。糖尿病には1型糖尿病と2型糖尿病があるが、日本人の糖尿病の約95%を占めているのが2型糖尿病である。2型糖尿病は、遺伝的素因に加齢、肥満、過食、運動不足およびストレス等の環境因子が加わって発症すると考えられている。このように日頃の生活習慣が糖尿病発症に大きく関与しており、中でも食事は生きる上で欠かせない。糖尿病治療の一つである食事療法は糖尿病患者の治療の基本であり、食事療法により血糖コントロールの状態が改善されると言われている (Diabetes Care 1994;17:30-36)。食事療法では食事の量および質の観点から行われており、肥満度を示すBMI (body mass index) が増加するとともに糖尿病の発症リスクは増加することから (Int J Obes 2010;34:332-339)、総エネルギーの適正化が重要であるといわれている。また、穀物の食物繊維が糖尿病発症リスクを低減すること (Arch Intern Med 2007;167:956-965)、食事の炭水化物による食後血糖値の上昇を示すGI (glycemic index) および食事で摂取される炭水化物の質と量を示したGL (glycemic load) と糖尿病の発症リスクとの関係についても報告されている (Diabetes Care 1997;20:545-550, Am J Clin Nutr 2008;87:627-637)。

【2型糖尿病発症における食後高血糖の重要性】

我々は一貫して糖尿病の研究を行ってきており、特に糖尿病発症過程において食後高血糖が重要であることに着目し、食後高血糖を引き起こすメカニズムについて解明してきた。

図1に示すように食後高血糖の人は、空腹時血糖値が正常または境界領域であっても食後の血糖値が糖尿病患者と同じくらいまで一過性に急上昇する。しかしながら通常健康診断では空腹時血糖値を測定することが多く、この食後の急激な血糖値上昇が見逃される傾向にあり、現在日本で糖尿病患者数が増加の一途を辿っている原因と考えられる。食後高血糖の持続は空腹時高血糖をも

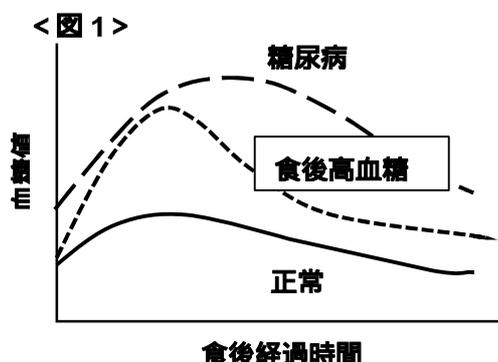
たらすため (Diabetes Care 2007;30:263-269) 食後高血糖は糖尿病前段階から発症への進展に重要な要素である (図2)。

【国内での糖尿病に対する取り組み】

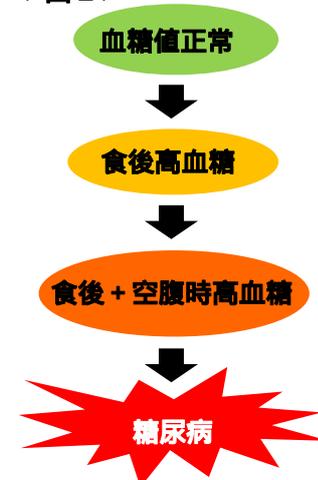
厚生労働省が2000年度から開始している国民の健康づくり運動の「健康日本21」にも糖尿病患者数が急激に増加していることから糖尿病が含まれており、糖尿病発症の予防・早期発見・合併症の予防が掲げられていた。この運動は第1次、第2次と続けられており、国民の健康づくりにおいていかに糖尿病発症予防および合併症へとつながってしまう高血糖の悪化・持続の予防が重要であるかが分かる。

【研究者の背景および食餌の性状と糖尿病との関り】

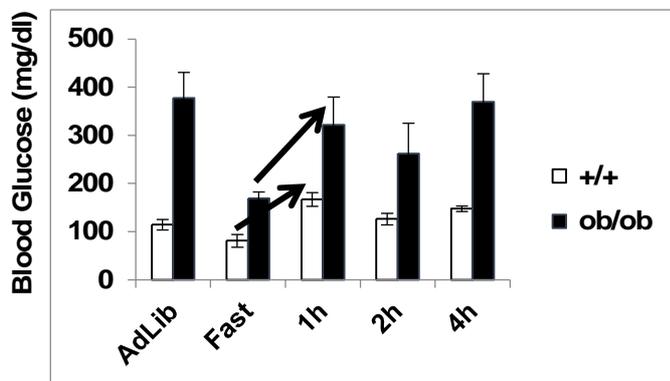
今まで我々は糖尿病病態下での肝臓における糖代謝調節機構の研究を行ってきた。その中で2型糖尿病モデルである ob/ob マウスを用いた実験で絶食後に再摂食させた際にはコントロールマウス (+/+) と比較して食後の急激な血糖値上昇がみられ (図3 矢印)、肝臓においては、糖新生酵素のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) およびグルコース-6-



< 図 2 >



< 図 3 血糖値の変化 >



フォスファターゼ (G6Pase) 発現の抑制障害を認め、食後血糖調節に関与するインクレチンの一つである グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の受容体発現が高く、特に血糖が急上昇する食後 1 時間において GLP-1 受容体機能を制御する caveolin-1 の発現低下することを見出した。GLP-1 は食事により小腸から分泌されるインクレチン (消化管ホルモンの一種) の一つで、膵臓 細胞および 細胞に作用し、グルコース依存性のインスリン分泌促進およびグルカゴン分泌抑制により糖新生が抑制され食後血糖上昇を抑える働きがある (Pharmacol Ther 2007;113:546-593、Diabetologia 2008;51:2263-2270)。このように我々は、食事により分泌される因子が、2 型糖尿病発症につながる食後高血糖に重要な役割を果たしている可能性を見出しており、日頃の食事と糖尿病発症との関連性について解明する研究を行うに至った。食事の量および質と糖尿病発症に関しては上記に記載したように多くの報告があるが、そこで我々が着目したのは食餌の性状である。これまでに報告されている食餌の性状と血糖値に関する論文では、オスの Balb/c マウスに 3 日または 17 週間粉状の餌を与えたところ、3 日間の短期間処理において、食後の血糖値の上昇が固形状の餌を与えたマウスよりも高く、粉状の餌は簡単に消化されて吸収されることが示され、17 週間という長期間粉状の餌を与え続けると高血糖状態を引き起こし、血清アドレナリンおよびノルアドレナリンの上昇、高血圧等全身的な高血糖に伴う兆候が見られるといった報告がされている (Life Sci 2014;103:8-14)。また、黒米のような硬いご飯とコシヒカリのご飯をマウスに 12 週間摂取させるとコシヒカリ摂取のマウスの血糖値よりも黒米を与えたマウスの血糖値が低くなり食後の血糖値の上昇を抑えることが報告されている (Biosci Biotechnol Biochem 2017;81:323-334)。2 型糖尿病モデルマウスでの検討では、固形の CRF-1 という餌をオートクレーブ処理、線処理、粉状化することにより硬さの異なる餌を作製し、16 週間および 36 週間与えたところ、一番固いオートクレーブ処理した餌では、体重が減少し、食後の血糖値も抑えられることが示されている (Diabetes Res Clin Pract 2006;74:1-7)。このように食事の性状が食後の血糖値に影響を与えることは分かっているが、しかしながら、食餌の性状が糖尿病発症前段階から発症過程に与える影響については検討されておらず未だ明らかになっていなかった。そこで 2 型糖尿病誘発モデルである ob/ob マウスを用いて、食餌の性状が糖尿病発症にもたらす影響について解明する研究を企てた。

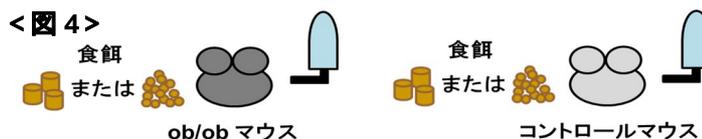
2. 研究の目的

今までの報告では正常マウスおよび 2 型糖尿病モデルマウスにおいて食餌の性状が食後の血糖値上昇を抑えるということが示されてきたが、2 型糖尿病モデルマウスの糖尿病発症する前段階から発症への過程に焦点を絞って食餌の性状が与える影響を解明することである。

3. 研究の方法

【2 型糖尿病モデルの ob/ob マウスを用いた実験方法】

ob/ob マウスは 4 週齢頃から血糖値が上昇し始めるので 4 週齢の ob/ob マウスおよびコントロールマウスを使用する。4 週齢から固形状および粉状の通常食餌 (CE-2 : 日本クレア) で飼育し 8 週齢まで続ける。摂取する食餌量が異なると体重等に影響し、食餌の性状が与える影響が検討出来ないので 1 日の食餌の量は一定量にする。飼育中は 1 週間毎に決まった時間に体重測定、血糖値およびヘモグロビン A1c の測定を行う (図 4)。さらに食餌を与えてから 1 週間毎に食後の血糖値の変化を検討するため、絶食 16 時間を自由飲水出来る環境にて行い、絶食後、固形状および粉状の通常食餌の一定量を 1 時間与え再び食餌を取り除きさらに 1 時間および 3 時間飼育する。各時間飼育したマウスの尾静脈より採血し、血中 GLP-1 レベル、ヘモグロビン A1c および血糖値を測定する。また GLP-1 は食事により小腸から分泌され、その受容体が肝臓だけでなく胃粘膜にも発現することから GLP-1 受容体の発現を解析するため各マウスから肝臓および胃を摘出し、凍結した胃および肝臓を OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) に包埋し、液体窒素で徐々に凍結する。クライオスタットで凍結切片を作製し、抗 GLP-1 受容体抗体にて免疫組織化学染色を行い GLP-1 受容体の発現について解析する。



飼育中は 1 週間毎に決まった時間に体重測定、血糖値およびヘモグロビン A1c の測定を行う (図 4)。さらに食餌を与えてから 1 週間毎に食後の血糖値の変化を検討するため、絶食 16 時間を自由飲水出来る環境にて行い、絶食後、固形状および粉状の通常食餌の一定量を 1 時間与え再び食餌を取り除きさらに 1 時間および 3 時間飼育する。各時間飼育したマウスの尾静脈より採血し、血中 GLP-1 レベル、ヘモグロビン A1c および血糖値を測定する。また GLP-1 は食事により小腸から分泌され、その受容体が肝臓だけでなく胃粘膜にも発現することから GLP-1 受容体の発現を解析するため各マウスから肝臓および胃を摘出し、凍結した胃および肝臓を OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) に包埋し、液体窒素で徐々に凍結する。クライオスタットで凍結切片を作製し、抗 GLP-1 受容体抗体にて免疫組織化学染色を行い GLP-1 受容体の発現について解析する。

【培養肝細胞を用いた実験方法】

肝臓での GLP-1 の役割については、in vivo において 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスの肝臓における GLP-1 過剰発現によって糖新生酵素の発現が低下し、糖新生が抑制されること (Diabetes 2007;56:1671-1679) および in vitro においてラット肝細胞への GLP-1 刺激によりグリコーゲンの合成が促進されること (Endocrinology 1998;139:2811-2817、Mol Cell Endocrinol 2003;204:43-50) が示されている。さらに caveolin-1 が GLP-1 シグナル系に大変重要な GLP-1 受容体の細胞内輸送および GLP-1 結合に関わっていると報告されている (Mol Endocrinol 2006;20:3400-3411)。そこで血糖値レベルが GLP-1 受容体の細胞内局在に影響を与えるかどうかについて細胞レベルで解析するため、マウス肝細胞株である AML12 細胞を採用した。高血糖状態化における GLP-1 受容体局在の変化について検討するために、GLP-1 受容体

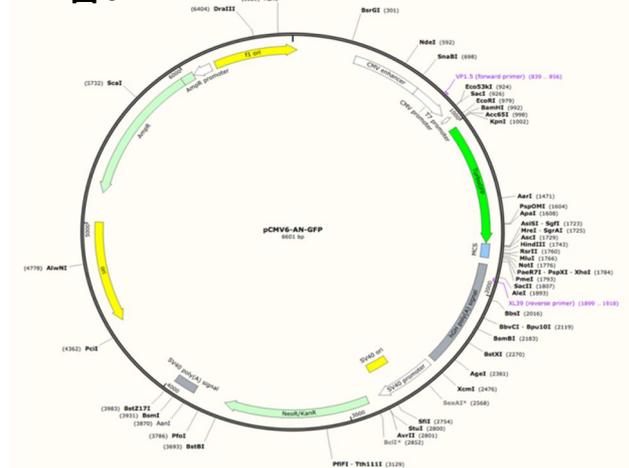
と Green Fluorescent Protein (GFP) が融合したタンパク質を発現するプラスミドを AML12 細胞へ導入後 G418 選択培地でクローン化し安定的に GLP-1 受容体と GFP の融合タンパク質を発現する AML12 細胞を樹立する。GLP-1 受容体と GFP の融合タンパク質が発現している AML12 細胞を高グルコースおよび低グルコース培養して GLP-1 受容体の局在を観察し、培地のグルコースレベルが GLP-1 受容体の局在に与える影響を検討する。

4. 研究成果

研究代表者は計画していた研究を遂行する予定であったが、精神的苦痛を被る環境下といった予期せぬ事態に陥り、それを免れるために研究場所を移動した。移動した場所は全く実験設備等が無い場所であったため研究設備の整備を行う必要が生じてしまった。限られた予算で研究機器を整備することに大変苦労したため最低限実験が行える環境が整うまで時間を要してしまっ。そのような中、新型コロナウイルス感染症が流行し今までに経験したことのない状況となり、医学部での動物実験の計画等が中断した。新型コロナウイルス感染症の影響に伴う科学研究費助成事業の補助事業期間の延長をさせて頂きながら研究に必要な機器等の整備を行っていった。

このように研究環境の整備に加え、新型コロナウイルス感染症により動物レベルの実験が出来ない状況が続いたため、血糖状態が GLP-1 シグナル系に重要な GLP-1 受容体に与える影響について細胞レベルで解析する準備も行っていった。マウス肝細胞株である AML12 細胞を高グルコース培地および低グルコース培地で培養し、細胞内の GLP-1 受容体の局在への影響を検討するためにマウス GLP-1 受容体に蛍光を発する GFP を付加した融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。GFP の N 末側にマウス GLP-1 受容体を融合して発現させるため、図5に示す GFP の発現ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) 内にマウス GLP-1 受容体の遺伝子子を組み込み作製するが、このプラスミドの作製に必要な実験機器が整って

< 図 5 >



なかったため業者に依頼して作製した。また、細胞内へ transfection 出来るようにプラスミドを増やし精製する必要があったが、この作業が出来る実験環境ではなかった上、このプラスミドは増え難いこともあり業者に委託して細胞へ transfection 出来る量を確保した。

今後は細胞培養が行える研究環境をさらに整えてこのプラスミドを AML12 細胞へ導入し、導入したプラスミドにはネオマイシン耐性遺伝子があるので、G418 選択培地での培養によりクローン化し、この GLP-1 受容体と GFP の融合タンパク質が安定して発現する AML12 細胞の樹立と GLP-1 受容体局在に培地のグルコースレベルが与える影響について解析を行っていく予定である。さらには動物レベルでの実験が行えるように動物飼育関連の器具等を整えていく状況である。

有難いことに科研費に採択されて自分が解明したいことについて研究を行いたかったが、この度このような私的にも社会的にも予期せぬことで思うように予定していた研究が進まない状況になってしまったことはとても残念であった。そのような環境下で何とか研究が出来るように実験環境の整備に努め、今回研究を行える環境を多少なりとも整備することが出来た。普通に研究が行えるには、研究設備等の物理的環境と人間関係等の社会的環境が重要であり、そして社会的環境が多くを占める精神的な健康状態が何よりも重要であると考えている。今後は意欲的に研究を進めていきたい。

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1件

1. 著者名 中村恭子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社ニューサイエンス社	5. 総ページ数 3
3. 書名 Medical Science Digest	

〔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
---------	---------