

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 2 日現在

機関番号：34305

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700766

研究課題名（和文）AMP 経口摂取による血糖上昇の緩和およびインスリン分泌に対する影響

研究課題名（英文）Influence on the raise of blood glucose and insulin secretion by AMP oral ingestion

研究代表者

樹山 敦子（KIYAMA ATSUKO）

京都女子大学・家政学部・講師

研究者番号：70405504

研究成果の概要（和文）：

生体エネルギー代謝調節に関わる AMPK（AMP activated kinase）の活性増強が高血糖状態の改善に有効であるかを検討するため、AMPK の基質である AMP をマウスに摂取させ、その効果と生理作用を解析と、AMP 添加、非添加の培地で培養した小腸上皮細胞での糖の取込みの違いについて検討した。しかし、いずれの実験においてもばらつきが大きく、一定の傾向を見いだすにはいたらなかった。

研究成果の概要（英文）：AMP activated kinase (AMPK) is a enzyme that plays a important role in cellular energy homeostasis. In this study, I examined the oral ingestion of AMP which is the substrate of AMPK, effect on the raise of blood glucose and insulin secretion in the mice, and the glucose uptake to IEC-6 cell from medium with AMP +/- . But in this experiment, the difference of AMP (+) or (-) does not become clear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：栄養生理学、代謝

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：栄養生理・栄養補助成分・AMP

1. 研究開始当初の背景

現在、肥満症や糖尿病などの生活習慣病の複合により、重篤な病態につながるメタボリックシンドロームの患者は急増している。生活習慣病は、食生活や運動習慣の改善により防ぐこ

とが可能な場合が多く、予防医学的にも食と運動への取組みの必要性が強く訴えられている。特に糖尿病はメタボリックシンドロームにおいて大きな危険因子に位置づけられており、増加し続ける糖尿病患者への対策は重

要な課題である。

糖尿病患者の増加の一因は高齢化であるが、一方で、生活スタイルの変容から糖尿病を含む生活習慣病発症の若年化が進んでいるのも事実である。加えて、日本人は欧米人に比べて膵β細胞が脆弱で、インスリン分泌能が低く、食の欧米化により膵機能の疲弊をきたしやすくなっていることも糖尿病患者の増加に拍車をかけていると考えられる。

糖尿病や耐糖能異常は高血圧に合併しやすく、食後高血糖は虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の独立危険因子である。近年、これらの大血管障害を合併する糖尿病患者の割合は増加している。高齢者の寝たきりの原因として脳梗塞が突出して多いこと、透析導入患者に占める糖尿病の有病率が高いことなど、人々の健康や我国の医療費問題を考えるうえで、耐糖能異常や糖尿病をいかに予防するか、早期に改善するかが重要なポイントとなる。

糖尿病に至る過程は、大きく①インスリン分泌不全、②インスリン抵抗性の二つに分けられる。糖尿病の治療では食餌療法・運動療法が基本となるが、インスリン抵抗性の改善には特に運動療法の効果が高い。運動により筋肉に存在するインスリン受容体が増加し、エネルギー源のブドウ糖がより多く取り込めるようになるからである。この骨格筋での糖の取込みと脂肪酸酸化の促進には AMPK (AMP activated kinase) が関与している。AMPK はインスリン受容体からのシグナル下流で活性化する経路とは別に、骨格筋の収

縮によっても活性化される。

AMPK は様々な代謝経路を仲介するが、なかでも抗肥満ホルモンであるレプチンの作用が AMPK 活性を介しており、レプチンによる脳視床下部での摂食行動抑制も AMPK 活性によって惹起するという報告 (Y. Minokoshi et al., *Nature* 428 (2002) 569-574.) や、高脂肪食餌での飼育により肥満および糖尿病を発症したマウスでは、レプチン抵抗性だけでなく、脳視床下部や骨格筋での AMPK 活性が変化しており、エネルギー代謝の異常に拍車をかけていることを示唆する報告もある (T. L. Martin et al., *J. Bio. Chem.* 281 (2006) 18933-18941.)。これらのことから AMPK が糖尿病や肥満の進行に深く関与していることが推測される。糖の取込みやエネルギー代謝に関わる AMPK の活性を増強することが糖尿病や肥満症の改善につながるか、AMPK の基質である AMP に着目し、その摂取が肥満及びインスリン抵抗性の改善に有効であるかを検討することとした。

2. 研究の目的

すでに AMP を混ぜた餌を与えたマウスでは、腸管での糖吸収が亢進すること、AMP を混和したブドウ糖液を投与したマウスでは血糖の上昇が緩やかであるが、インスリン分泌には変化がみられないことを明らかにしている。

これらの結果は AMP 摂取が AMPK 活性に影響を与えている可能性を示唆しているが、その詳細な機序につ

いては不明である。

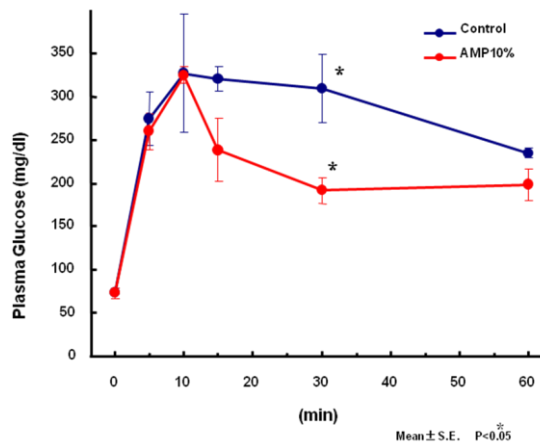


Figure 1. Effect of AMP ingestion on the plasma glucose level.

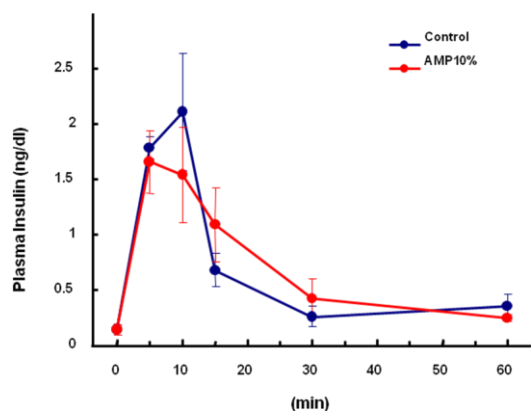


Figure 2. Effect of AMP ingestion on the plasma Insulin level.

そこで肥満とそれに伴うインスリン抵抗性を示す個体に AMP を摂取させた場合の糖取込み、血糖上昇に対する影響を検討することとした。

また、培養小腸上皮細胞をもちい、培地への AMP 添加による糖取込みと AMPK 活性への影響を観察し、AMP 摂取により認められた血糖上昇抑制の機序を明らかにし、AMP の生体物質としての可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウスは AMP 投与前 24 時間絶食させ(自由飲水)、5%Glucose 液、または 10%の AMP を添加した Glucose/AMP 混液ゾンデを用いてマウスへ経口投与し(0.5 ml/匹)た。投与後、5、10、15、30、分から 180 分後まで 30 分ごとにエーテル麻酔下で心臓または門脈より採血し、分析には血漿を用いた。組織および筋肉は採取後液体窒素で凍結し分析に用いるまで -80°C で保存した。

IEC-6 細胞はグルコース (-) 培地に弛緩後、的当量のグルコース液、又はグルコース/AMP 混液を添加し、経時的に培地又は細胞の回収を行い、糖取込み量、AMPK 活性の測定を行った。

(1) 血液成分の分析

- ① 血糖はグルコース CII-テストワコー(和光純薬)を用いて測定した(酵素法)。
- ② 血中遊離脂肪酸はデタミナー NEFA(協和メデックス)を用いて測定した(酵素法)。
- ③ 血中インスリンは森永超高感度インスリン測定キットを用いて測定した(サンドイッチ ELISA 法)。

(2) IEC-6 細胞のグルコース取込み

経時的に回収した培地中のグルコース濃度をグルコース CII-テストワコー(和光純薬)を用いて測定した(酵素法)。

(3) AMPK活性の測定

肝臓、膵臓、小腸、骨格筋（ヒラメ筋および長肢伸筋）は採取後すぐに液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

各組織および回収したIEC-6細胞は、Lysis Buffer A[E. K. Kim et al., J. Biol. Chem. 279 (2004) 19970-19976] で可溶化し、SDS-PAGEで展開後、Western blot法により検出した。検出したAMPおよびPhospho-AMP (P-AMPK) をNIH imagerを用いて定量化し、AMPの活性レベルを測定した。AMPおよびP-AMPKの検出については抗 α AMPK抗体、抗P- α AMPK抗体 (Cell signaling)を用いた。

4. 研究成果

培養した IEC-6 細胞は AMP(+)/AMP(-)の条件下におき、糖取り込みと AMPK 活性の変化を検討した。その結果、AMP(+)条件下で糖の取り込み速度の上昇がうかがえる結果が得られたが、明確な違いを認めるにいたらなかった。

グルコース液及びグルコース/AMP混液を経口投与したマウスの組織（小腸、腓腹筋・ヒラメ筋）および上記条件のIEC-6細胞でAMPK活性に変化がみられるかを検討するため、抗AMPKおよび抗p-AMPK抗体を用いて定量化を試みた。しかし、いずれの組織においても測定値の個体間のばらつきが大きく群間での比較検討するまでにいたらなかった。試料保存や試料調整の改良を図るためにも再

度条件検討をおこなう必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樹山 敦子 (KIYAMA ATSUKO)
京都女子大学・家政学部・講師
研究者番号：70405504