

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22790855

研究課題名（和文）

単純性糖質摂取による耐糖能異常の発症機序の解明とインクレチンの役割

研究課題名（英文） To elucidate the mechanism by which excessive intake of monosaccharide impairs glucose tolerance and the role of incretin

研究代表者

清野 祐介 (SEINO YUSUKE)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：80534833

研究成果の概要（和文）：C57BL/6マウスを通常食群（CD群）、38.5%高シヨ糖食群（HSD群）、高スターチ食群（CS群）に分けて5週間摂取させた。HSD群においてCD群やCS群と比較して絶食16時間後の経口糖負荷試験では負荷後早期（10, 15分）に有意な血糖上昇を認めたが、負荷前および60分ではCD群と同程度であった。高シヨ糖食負荷による耐糖能障害の機序については、実験結果より（1）腸管からのGLP-1分泌低下に伴う相対的インスリン分泌の低下（2）肝臓でのグルコキナーゼ活性低下によるグリコーゲン貯蓄障害が関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

C57BL/6J mice received a control diet (CD), a 38.5% sucrose diet (HSD) or high-starch diet (CS) for 5 weeks. An oral glucose tolerance test (OGTT) showed that plasma glucose levels in the early phase were higher in HSD group than in other groups. The OGTT also showed no differences in blood glucose levels at baseline and 60 min among three groups. Mice fed HSD showed that glucagon-like peptide-1 secretion (GLP-1) was impaired, and that insulin secretion was relatively reduced. Hepatic glucokinase activity was significantly reduced and the accumulation of glycogen in the liver was suppressed during OGTT in HSD group. We therefore demonstrate reduction in hepatic glucokinase activity and impairment in GLP-1 secretion contributes to the glucose intolerance by excessive ingestion of monosaccharide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インクレチン、グルコキナーゼ、スクロース、耐糖能障害

## 1. 研究開始当初の背景

2007年に厚生省が行った糖尿病の実態調査によれば日本人の糖尿病人口は890万人、境界型も含めると2210万人と有病率の急速な

上昇が見られる。この上昇は、もともとインスリン分泌能が悪いという日本人の遺伝的背景に加え、生活習慣の欧米化による動物性脂肪を含めた総脂肪摂取の増加、単純性糖質

の摂取の増加によるためと考えられる。高脂肪食に関する研究は近年目覚ましい進歩をとげてきた。

しかしながら、高シヨ糖食を含めた高炭水化物食に関しては、耐糖能障害の有無、腸管からの糖吸収やインクレチン分泌、肝臓における糖代謝作用、膵β細胞のインスリン分泌効果なども明らかではない点が多い。さらにこのような高炭水化物食負荷時の腸管、肝臓、膵臓における糖代謝を臓器横断的かつ総合的に解析し、糖尿病発症との関わりを解明した成績は皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究は、高シヨ糖食や高スターチ食を慢性的に与えたマウスの耐糖能障害の有無を確認し、(1)腸管、肝臓、膵β細胞の機能を解析すること(2)消化管ホルモンであるインクレチン(GIP, GLP-1)分泌や糖代謝におけるインクレチン効果を検討すること(3)耐糖能障害がある場合、GLP-1アナログ製剤やDPP-IV阻害薬による耐糖能障害の改善効果における腸管、肝臓、膵内分泌機能を総合的に解析することを目的としている。

## 3. 研究の方法

C57BL6 マウスを通常食群 (CD 群)、38.5%高シヨ糖食群 (HSD 群)、高スターチ食群 (CS 群) に分けて 5 週間摂取させた後以下の検討を行う。

- (1) 経口糖負荷試験、経静脈糖負荷試験
- (2) キシロース負荷試験
- (3) 経口糖負荷試験時の GIP や GLP-1 の分泌
- (4) 単離膵島実験によるインスリン分泌試験
- (5) インスリン負荷試験
- (6) 骨格筋のインスリンシグナルを western blot 法にて確認
- (7) 肝臓での糖新生に関わる遺伝子変化や糖

負荷時のグリコーゲン貯蓄

(8) 肝臓のインスリンシグナルを western blot 法にて確認

(1)にて耐糖能障害の有無を確認し、耐糖能障害が存在する場合は(2)-(8)にて耐糖能障害の機序を追及する。また GLP-1 アナログ注射の前投与処置や、DPP-IV阻害剤の投与にて耐糖能が改善するか、さらに改善する場合は(2)-(8)のどの機序に関与しているかを検討する。

## 4. 研究成果

HSD群においてCD群やCS群と比較して絶食16時間後の経口糖負荷試験では負荷後早期(10, 15分)に有意な血糖上昇を認めたが、負荷前および60分ではCD群と同程度であった。インスリン分泌に関しては3群間で差を認めなかった。一方経静脈的糖負荷試験においては3群間で血糖値もインスリン分泌も差を認めなかった。

消化管の解析-経口キシロース試験において空腹時のグルコース吸収はHSD群とCD群で差を認めなかった。

インクレチン分泌-グルコース負荷後のGIP分泌は負荷後15分でCS群ではCD群やHSD群と比較して有意な増加を認めた。グルコース負荷後15分のGLP-1分泌はHSD群でCD群やCS群と比較し有意な低下を認めた。

膵島の解析-単離膵島実験でグルコース応答性インスリン分泌能はHSD群とCD群で有意差は見られなかった。

インスリン負荷試験-HSD群ではCD群やCS群と比較してインスリン感受性の亢進を認めた。骨格筋の解析-HSD群においてインスリン投与後のAktのリン酸化が他2群と比較し有意な

亢進を認めた。

肝臓の解析-空腹時のPEPCKの発現は、HSD群においてCD群やCS群と比較して上昇を認めた。

肝臓の中性脂肪含有量は、HSD群において他2群と比較し有意な上昇がみられた。

16時間絶食後のグリコーゲン含有量は測定できなかった。経口糖負荷試験施行時の肝臓グリコーゲン含有量はHSD群において負荷後60分、120分でCD群やCS群と比較し有意に低下を認めた。また、肝臓グルコキナーゼ発現ならびに活性はHSD群では他2群と比較し低下を認めた。インスリン投与後のAktのリン酸化やGSK3 $\beta$ のリン酸化は3群間で変化は認めなかった。

以上より高ショ糖食負荷による耐糖能障害の機序については、(1)腸管からのGLP-1分泌低下に伴う相対的インスリン分泌の低下(ただし膵 $\beta$ 細胞機能は正常)(2)肝臓でのインスリン非依存性のグルコキナーゼ活性低下によるグリコーゲン貯蓄障害が関与すると考えられた。また高スターチ食では耐糖能障害が引き起こされなかったことからブドウ糖ではなく果糖の慢性投与がGLP-1分泌低下や肝臓でのグルコキナーゼ発現低下に関与していることが明らかとなった。近年肝臓にGLP-1受容体が存在しているとの報告があり、実際臨床の現場ではNASHの様な脂肪肝にインクレチン製剤が効果的であるとの報告もある。我々は、果糖の慢性的投与で生じるGLP-1分泌低下が肝臓のグルコキナーゼ発現や活性の低下を引き起こすと考えHSD群に各種インクレチン製剤を使用した実験を行った。

HSD群にGLP-1アナログ製剤であるEx-4あるいは生理食塩水を前投与し経口糖負荷試験を行った。Ex-4投与によりインスリン分泌過剰が

引き起こされ耐糖能は改善したが、肝臓のグリコーゲン貯蓄は改善されなかった。Ex-4による腸管運動低下や糖吸収抑制が引き起こされたものと考えられた。

DPP-4阻害薬に関しては長期負荷を行った。

C57BL6マウスに15週間の38.5%高ショ糖食を与えても、5週の短期投与同様に経口糖負荷試験において耐糖能障害が出現することを確認した。

C57BL6マウスに通常食群を15週間与えた群(CD群)、ならびに38.5%高ショ糖食を与えた群(HSD群)ならびに15週間の高ショ糖食に加えて後半の10週間DPP-4阻害剤を飲水させた(HSD+DPP群)の3群に関して経口糖負荷試験により耐糖能を評価した。HSD+DPP群ではインスリン分泌過剰による耐糖能の改善は生じるもGLP-1分泌の亢進や肝臓のグリコーゲン貯蓄の改善は引き起こされなかった。

肝臓のGLP-1シグナルとグルコキナーゼ活性やグリコーゲン貯蓄に関しては直接的検証ができず今後の研究課題となった。

果糖はブドウ糖比較して摂取時には血糖値の上昇が少ない。しかしながら慢性的に摂取すると肝臓での脂肪合成を促進させ脂肪肝を引き起こしたり、高血圧を引き起こしたりすることが今までに報告されていた。今回我々は新たに果糖が肝臓のグルコキナーゼの活性低下を引き起こすことを見つけた。次世代の糖尿病薬としてグルコキナーゼ活性化薬が期待されているが、果糖の摂取量が多い糖尿病患者にはより有効である可能性も考えられる。一方でGIPやGLP-1分泌機構に関しては、まだまだ研究段階である。果糖がGLP-1分泌を抑制するメカニズムに関しては今後のさらなる検討を必要とする。

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1件)

① Ingestion of a moderate high-sucrose diet results in glucose intolerance with reduced liver glucokinase activity and impaired glucagon-like peptide-1 secretion

Sakamoto E\*, Seino Y\*, Fukami A, Mizutani N, Tsunekawa S, Ishikawa K, Ogata H, Uenishi E, Kamiya H, Hamada Y, Sato H, Harada N, Toyoda Y, Miwa I, Nakamura J, Inagaki N, Oiso Y, Ozaki N.

\*contributed equally to this work

Journal of Diabetes Investigation

2012. 3. 432-440. 査読有

[学会発表] (計5件)

① 高スクロース食負荷マウスにおける耐糖能障害発症機序の検討

坂本英里子、尾崎信暁、清野祐介、深見亜也子、佐藤寛之、原田憲雄、水谷直広、豊田行康、三輪一智、稲垣暢也、大磯ユタカ

第14回日本病態栄養学会年次学術集会

2011年1月16日 横浜

② 高シヨ糖食負荷は肝臓グルコキナーゼ活性低下とGLP-1分泌不全を伴う耐糖能障害を引き起こす

坂本英里子、尾崎信暁、清野祐介、深見亜也子、佐藤寛之、原田憲雄、恒川新、豊田行康、三輪一智、稲垣暢也、大磯ユタカ

第54回日本糖尿病学会年次学術集会

2011年5月20日 札幌

③ 高スターチ食は高スクロース食と異なり耐糖能障害を来さない

尾方秀忠、清野祐介、坂本英里子、尾崎信暁、原田憲雄、深見亜也子、石川孝太、上西栄太、豊田行康、三輪一智、神谷英紀、濱田洋司、中村二郎、稲垣暢也、恒川新、大磯ユタカ

2012年1月14日 京都

④ グルコースとフルクトースのGIP, GLP-1分泌に及ぼす影響

尾方秀忠、三浦英里子、清野祐介、尾崎信暁、

原田憲雄、石川孝太、大川哲司、藤谷淳、上西栄太、加藤二郎、姫野龍仁、深見亜也子、神谷英紀、濱田洋司、中村二郎、稲垣暢也、恒川新、大磯ユタカ

第55回日本糖尿病学会年次学術集会

2012年5月19日 横浜

⑤ 新しいGIP分泌調整機構の解明-プロゲルカゴンノックアウトマウスによる検討

清野祐介、深見亜也子、尾崎信暁、恒川新、林良敬、大磯ユタカ

第55回日本糖尿病学会年次学術集会

2012年5月18日 横浜 シンポジウム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 祐介 (SEINO YUSIKE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：80534833

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし