

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300276

研究課題名(和文) 消化管を標的とした代謝制御による生活習慣病リスク低減に関する研究

研究課題名(英文) Study on risk reduction of lifestyle-related diseases due to modulations of digestion/absorption capability of carbohydrates.

研究代表者

合田 敏尚 (Goda, Toshinao)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：70195923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：糖質の消化吸収遅延による食後の血糖上昇抑制が慢性炎症の抑制を介して生活習慣病の発症・進展を抑制するという仮説を、動物モデルと健常者における研究により検証した。2型糖尿病モデルラットに難消化性デンプン(RS)添加食あるいはグルコシダーゼ阻害剤を投与すると、食後血糖上昇が抑制されるとともに、脂肪組織および末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現が低下し、動脈組織における接着因子の発現も低下した。これらの炎症は、抗酸化食品成分(EGCG)添加食の投与によっても抑制された。また、健診受診者男性において、食べる速さと血漿中の炎症関連因子(IL-1)濃度の間には、強い関連性があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The hypothesis that suppression of postprandial hyperglycemia due to retardation of digestion/absorption of carbohydrates leads to reductions of chronic inflammation and resulting lifestyle-related disease risk, was examined in animal models and human subjects. Feeding a diet containing resistant starch (RS) or alpha-glucosidase inhibitor (miglitol) in type 2 diabetes model rats caused a reduction in postprandial glycaemic levels, and it led to suppression of inflammation-related gene expressions in adipose tissue and peripheral leukocytes, along with reduced expression of cell adhesion molecules in aorta tissue. The postprandial hyperglycemia-associated inflammation was suppressed by consumption of anti-oxidation food factors such as EGCG. Cross-sectional studies of healthy subjects showed that a higher rate of eating is associated with plasma IL-1b levels, suggesting that IL-1b is a marker for inflammation, presumably caused by hyperglycemia.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食後高血糖 小腸 バイオマーカー 遺伝子発現 慢性炎症

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病、脂質異常症などの慢性代謝性疾患を中心とした生活習慣病のリスク低減のためには、インスリン分泌能力の遺伝的に低い日本人にとっては、肥満の予防を図り、インスリン抵抗性を抑制することに加えて、食後高血糖を抑制することが重要な方策と考えられる。食後高血糖は、インスリン分泌を亢進させて体内における脂肪の合成・蓄積の促進要因になるだけでなく、それ自体が体内の様々な臓器に慢性炎症をもたらす要因になることを示す知見が集積してきた。

(2) 申請者らは、これまでの研究により、末梢血白血球の遺伝子発現は食後の血糖上昇の履歴をよく反映しており、末梢血白血球では、血糖上昇に伴って、短期的にもあるいは慢性的にも、炎症関連遺伝子や白血球活性化・細胞接着に関与する遺伝子の発現が変動していることを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、消化管における糖質の消化吸收遅延による食後の血糖調節に焦点を当て、これが体内の慢性炎症の抑制をもたらす分子機構を、血糖依存性の炎症関連指標およびインスリン感受性・抵抗性指標（バイオマーカー）を用いて解明することを目的とした。

(2) これまで開発してきた食後の高血糖に関連する慢性代謝疾患発症・進展リスク候補バイオマーカーの妥当性を、日本人を対象として検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 自然発症 2 型糖尿病モデルラット (OLETF) を用い、難消化性デンプンの摂取や  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤投与による糖質の消化吸收遅延が、小腸、脂肪組織および末梢血白血球における遺伝子の発現に及ぼす影響を調べ、その転写制御機構をクロマチン免疫沈降法によって解析した。

(2) 非肥満糖尿病モデルラット (GK) に緑茶カテキン (エピガロカテキンガレート EGCG) を添加した飼料を摂取させ、末梢血白血球、脂肪組織および肝臓における炎症関連遺伝子や細胞接着因子の発現変動を検討した。

(3) 単球様培養細胞 U937 および THP-1 の培養液中のグルコース濃度を変化させ、TNF  $\alpha$  による炎症関連遺伝子の発現誘導が、グルコース濃度によって変動することを確認した上で、高グルコース刺激による炎症関連遺伝子転写調節機構を、クロマチン免疫沈降法を

用いて解析した。

(4) 肝臓実質細胞様 HepG2 細胞の培養液中のグルコース濃度を変化させ、高グルコース刺激ならびにインスリンによって、インスリン抵抗性あるいは酸化傷害に関連すると考えられている遺伝子の発現が変化するかを調べた。

(5) 地域健康診査受診者の血液生化学検査データ、生活習慣調査データ、食物摂取頻度調査データおよび血清試料を解析し、日本人における食後高血糖関連・炎症関連バイオマーカーおよびその変動要因と代謝性疾患リスク指標との関連性を分析した。

(6) 健康人および軽度耐糖能低下者を対象として、経口グルコース負荷試験を行い、グルコース負荷後 3 時間までの血液の末梢血白血球における遺伝子の発現変動を解析し、炎症性サイトカインおよび細胞接着因子に関連した遺伝子群の発現変動の特徴を調べた。

(7) 健康な成人男性 51 名を無作為に 2 群に割り付け、介入群には低グリセミックインデックス試験食を 5 週間継続摂取させ、体重、BMI、腹囲に及ぼす影響を調べるとともに、これらの変動と関連する血清生化学指標を探索した。

(8) 2 型糖尿病患者に食後血糖上昇抑制剤 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤ミグリトールおよび DPP4 阻害剤アナグリプチン) を 3 か月間投与し、炎症関連バイオマーカーが食後高血糖の履歴の抑制を鋭敏に反映するかを検証した。

### 4. 研究成果

(1) 自然発症 2 型糖尿病モデルラット (OLETF) に難消化性デンプン (RS) 添加食を 5 週間投与したところ、空腸上部における小腸消化吸收関連遺伝子の発現が著しく低下するとともに、ヒストンアセチル化酵素である GCN5 の遺伝子発現が有意に低下した。クロマチン免疫沈降法により、RS 添加食を投与したラットでは、Na-グルコース輸送体 SGLT1 遺伝子上への GCN5 の結合が減少し、ヒストン H3 のアセチル化が低下していることが明らかになった。また、RS 添加食を投与した OLETF ラットの脂肪組織では、アディポネクチン mRNA の発現が増大する一方、レジスチン mRNA の発現が低下し、炎症ならびにマクロファージの遊走に関与する CD11c や CD18 の遺伝子発現が著しく低下することが明らかになった (図 1)。

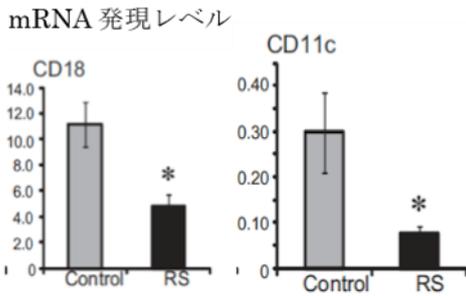


図1 難消化性デンプン添加食の投与は、2型糖尿病モデルラット (OLETF) の脂肪組織におけるマクロファージ浸潤因子 (インテグリン) の発現を抑制する。

OLETF ラットに  $\alpha$  グルコシダーゼ阻害剤ミグリトール添加食を投与して血糖上昇を抑制すると、末梢血白血球において、炎症関連遺伝子である TNF  $\alpha$  および IL-6 の mRNA 発現量の増大が抑制されるとともに、動脈組織における接着因子 E-セレクトインの遺伝子発現ならびに血中の可溶性接着因子濃度が有意に低下することが明らかになった。

(2) 食後高血糖に関連する炎症の抑制を標的とした抗酸化食品成分の作用機構の検討:

非肥満インスリン分泌低下型の糖尿病モデルである GK ラットに緑茶カテキン (EGCG) を添加した飼料を摂取させたところ、0.1% EGCG 添加食の投与により、脂肪組織、末梢血白血球および肝臓における炎症関連遺伝子 (IL-1  $\beta$ 、IL-18) の発現が抑制されるとともに、脂肪組織におけるインスリン抵抗性関連遺伝子 (レジスチン) の発現が抑制された (図2)。

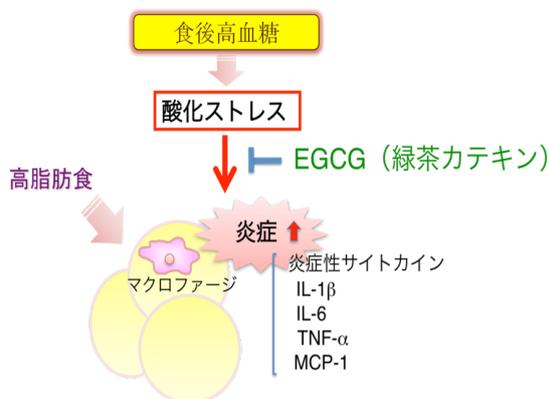


図2 緑茶カテキン (EGCG) 添加食の投与は、脂肪組織、末梢血白血球および肝臓における炎症の進展を抑制する。

(3) 培養細胞における高グルコース刺激による炎症性サイトカイン遺伝子の発現制御機構の解析:

ヒト単球様細胞 U937 を高グルコースかつ TNF  $\alpha$  の存在下で培養することによって、炎症関連遺伝子 TNF  $\alpha$  と IL-1  $\beta$  の発現が著しく増大した。このとき、TNF  $\alpha$  の遺伝子の転写領域では、ヒストン H3 のアセチル化ならびにヒストン H3K4 および H3K36 のトリメチル化が亢進するとともに、転写伸長反応を促進する Brd4 の結合が増大し、転写が促進されることが明らかになった。

ヒト単球様細胞 THP-1 を高グルコースで24時間培養したところ、その後、低グルコースで7日間培養した後でも、TNF- $\alpha$  の遺伝子発現が有意に高まっていた。さらに、この細胞では、転写活性化に関与するヒストン H3 のアセチル化修飾が、TNF  $\alpha$  遺伝子の転写開始点付近で増大していた。それゆえ、短期的な高血糖刺激の履歴は、白血球における炎症性サイトカイン遺伝子のヒストンコードの変化を介して、炎症性サイトカインの発現を制御することが示唆された。

(4) 肝臓由来培養細胞におけるインスリン感受性・抵抗性関連遺伝子および酸化傷害関連遺伝子の発現制御機構の解析:

肝臓由来細胞 HepG2 の培養液に、インスリン抵抗性惹起物質である TNF- $\alpha$  を添加したところ、グルタチオン合成関連酵素  $\gamma$ -GTP1 の遺伝子発現が増大し、それと同調して活性酸素除去酵素 SOD2 の遺伝子発現が増大することが明らかになった。

(5) 健診受診者における食後血糖上昇要因と炎症関連指標の関連性の検討:

健診受診者男性における食べる速さと関連する身体計測値や血液生化学検査を検討したところ、食べる速さと血漿 IL-1  $\beta$  濃度との間には、きわめて強い正の関連性があることが明らかになった。また、食べる速さは、インスリン抵抗性候補マーカー (ALT) の血漿濃度と関連することも明らかになった。

(6) 健康人および軽度耐糖能低下者における糖負荷試験による炎症関連指標の妥当性の検討:

健康人 48 名に対して経口グルコース負荷試験を行い、グルコース負荷 2 時間後の血漿グルコース高値群 (軽度耐糖能低下者) の末梢血白血球における遺伝子発現を、対照群と比較したところ、軽度耐糖能低下者では、末梢血白血球における IL-1  $\beta$  および IL-18 の遺伝子発現量が、空腹時とグルコース負荷後のいずれでも高く、末梢血白血球における TNF- $\alpha$  の遺伝子発現は、糖負荷後に対照群よりも高まっていることが明らかになった。それゆえ、食後高血糖が持続しやすい人は、炎症のリスクが増大していることが示唆された。

(7) 食後高血糖抑制介入試験による炎症関連指標の妥当性の検討:

健康な成人男性 51 名を年齢と BMI を対応させた上で、無作為に介入群と対照群に割り付け、介入群には低グリセミックインデックス食を 5 週間継続摂取させたところ、体重、腹囲、BMI が有意に減少するとともに、血漿  $\gamma$ -GTP 活性が有意に低下した。

(8) 2 型糖尿病患者に食後血糖上昇抑制剤 (ミグリトールおよびアナグリプチン) を 3 か月投与したところ、血中の IL-8 および可溶性接着因子 (sE-セレクトリン、sVCAM-1) の濃度が有意に抑制された。それゆえ、食後高血糖の抑制は炎症および動脈硬化のリスクを抑制することが示唆された (図 3)。

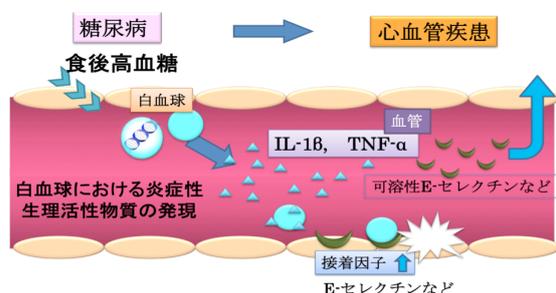


図 3 食後高血糖が炎症を介して心血管疾患リスクを高める機序 (仮説)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

- 1) Harazaki, T., Inoue, S., Imai, C., Mochizuki, K., and Goda, T., Resistant starch improves insulin resistance and reduces adipose tissue weight and CD11c expression in the adipose tissues of OLETF rats. *Nutrition*, 査読有, 30: 590-595, 2014
- 2) Inamochi, Y., Mochizuki, K., and Goda, T., Histone code of genes induced by co-treatment with a glucocorticoid hormone agonist and a p44/42 MAPK inhibitor in human small intestinal Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta- General Subjects*, 査読有, 1840: 693-700, 2014
- 3) Imai, C., Saito, M., Mochizuki, K., Fuchigami, M., Goda, T., and Osonoi, T., Cotreatment with the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol and DPP-4 inhibitor sitagliptin improves glycemic control and reduces the expressions of CVD risk factors

in type 2 diabetic Japanese patients.

*Metabolism*, 査読有, 63: 746-753, 2014

4) Shimada, M., Mochizuki, K., and Goda, T., Methylation of histone H3 at lysine 4 and expression of the maltase-glucoamylase gene are reduced by dietary resistant starch. *J. Nutr. Biochem.* 査読有, 24: 606-612, 2013

5) Mochizuki, K., Inoue, S., Miyauchi, R., Misaki, Y., Shimada, M., Kasezawa, N., Tohyama, K., and Goda, T., Plasma sE-selectin level positively correlated with neutrophil count and diastolic blood pressure in Japanese men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 59: 447-453, 2013

6) Uchiyama, Y., Suzuki, T., Mochizuki, K., and Goda, T., Dietary supplementation with a low dose of (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces pro-inflammatory responses in peripheral leukocytes of non-obese type 2 diabetic GK rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 59, 541-547, 2013

7) Uchiyama, Y., Suzuki, T., Mochizuki, K., and Goda, T., Dietary supplementation with (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces inflammatory response in adipose tissue of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *J. Agr. Food Chem.* 査読有, 61: 11410-11417, 2013

8) Honma, K., Mochizuki, K., and Goda, T., Induction by fructose force-feeding of histone H3 and H4 acetylation at their lysine residues around the Slc2a5 gene and its expression in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 77: 2188-2191, 2013

9) Imai, C., Harazaki, T., Inoue, S., Mochizuki, K., and Goda, T., Inhibition of postprandial hyperglycemia by either an insulin-dependent or -independent drug reduces the expression of genes related to inflammation in peripheral leukocytes of OLETF rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 77: 2305-2308, 2013

10) Mochizuki, K., Misaki, Y., Miyauchi, R., Takabe, S., Shimada, M., Kuriki, K., Ichikawa, Y., Goda, T. A higher rate of eating is associated with higher circulating interleukin-1b concentrations in Japanese men not being treated for metabolic diseases. *Nutrition*, 査読有, 28: 978-983, 2012

11) Mochizuki, K., Miyauchi, R., Misaki, Y., Kasezawa, N., Tohyama, K., and Goda, T. Associations between leukocyte counts and cardiovascular disease risk factors in apparently healthy Japanese men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 58: 181-186, 2012

12) Yoshinaga, Y., Mochizuki, K., and Goda, T., Trimethylation of histone H3K4 is associated with the induction of fructose-inducible genes in rat jejunum. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 査読有, 4179: 605-611, 2012

13) Mochizuki, K., Miyauchi, R., Goda, T. (7名中7番目), Accumulation of visceral fat is positively associated with serum ALT and  $\gamma$ -GTP activities in healthy and preclinical middle-aged Japanese men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 査読有, 57: 65-73, 2011

14) Mochizuki, K., Misaki, Y., Ichikawa, Y. (8名中7番目), Goda, T. (8名中8番目), Circulating interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 concentrations are closely associated with  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activity in middle-aged Japanese men without obvious cardiovascular diseases. *Metabolism*, 査読有, 60: 914-922, 2011

15) Fujimoto, S., Goda, T., Mochizuki, K. In vivo evidence of enhanced di-methylation of histone H3 K4 on upregulated genes in adipose tissue of diabetic db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 査読有, 404: 223-227, 2011

16) Mochizuki, K., Fukaya, N., Tanaka, Y., Fuchigami, M., Goda, T. Treatment with the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol from the preonset stage in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats improves glycemic control and reduces the expression of inflammatory cytokine genes in peripheral leukocytes. *Metabolism*, 査読有, 60: 1560-1565, 2011

17) Mochizuki, K., Misaki, Y., Miyauchi, R., Takabe, S., Shimada, M., Ichikawa, Y., Goda, T. Associations between markers of liver injury and cytokine markers for insulin sensitivity and inflammation in middle-aged Japanese men not being treated for metabolic diseases. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 査読有, 57: 409-417, 2011

〔学会発表〕(計 26 件)

- 1) 原崎友美ら、「レジスタントスターチによるインスリン抵抗性の改善と脂肪組織における白血球接着関連遺伝子発現の抑制」第 54 日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月、札幌
- 2) 今井千裕ら、「DPP-4 阻害剤および  $\alpha$ GI による食後高血糖の抑制は末梢血白血球における炎症関連遺伝子発現を抑制する」第 54 日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月、札幌
- 3) 合田敏尚、「末梢血白血球における炎症関連遺伝子発現からみた食後高血糖抑制の意義」(シンポジウム「医薬食融合と健康長寿」) 第 16 回静岡健康・長寿学術フォーラム、2011 年 10 月、静岡
- 4) 井上聖哉ら、「ヒストンコードを介した糖応答性小腸消化吸收関連遺伝子の転写制御機構」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月、京都
- 5) 稲用裕子ら、「小腸様細胞株 Caco-2 細胞におけるスクラーゼ・イソマルターゼ遺伝子発現に対するメチル化ヒストン H3K4 結合タンパク質 CHD1 の役割」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月、京都
- 6) Goda T. et al, Estimation of an optimum intake level of epigallocatechin gallate for suppression of inflammation in type 2 diabetic GK rats., *Experimental Biology* 2012, April, 2012, San Diego, USA,
- 7) 内山弓子ら、「非肥満 2 型糖尿病モデル後藤-柿崎 (GK) ラットの腸間膜脂肪組織における炎症関連遺伝子発現に対する緑茶カテキンの効果」第 55 日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月、横浜
- 8) 今井千裕ら、「DPP-4 阻害剤または  $\alpha$ -GI の長期投与による耐糖能の改善と末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現抑制」第 55 日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月、横浜
- 9) 山崎順平ら、「健康中年者において血清  $\gamma$ -GTP 活性は、空腹時血糖および血漿 IL-1 $\beta$  と正の関連がある：住民健康診査における横断研究」第 55 日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月。横浜
- 10) Hariya N. et al, Improving glucose fluctuation by miglitol reduces serum inflammatory protein levels in type 2 diabetic Japanese patients. 9<sup>th</sup>

International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress, November, 2012, Kyoto, Japan

11) Imai C. et al, Cotreatment of miglitol and sitagliptin reduces circulating proteins related to CVD in type 2 diabetic Japanese patients. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress, November, 2012, Kyoto, Japan

12) 山田真実ら、「脂肪細胞における脂肪蓄積におよぼすプロモドメインたんぱく質 Brd4 役割」第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月、福岡

13) Uchiyama Y. et al, Dietary supplementation with a low dose of (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces pro-inflammatory response in peripheral leukocytes of non-obese type 2 diabetic GK rat., Experimental Biology, April, 2013, Boston, USA

14) Uchiyama Y. et al, Dietary supplementation with a low dose of (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces pro-inflammatory response in the adipose tissue and the muscle of non-obese type 2 diabetic GK rat. The 5th International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome, April, 2013, Vienna, Austria

15) 内山弓子ら、「非肥満 2 型糖尿病モデル GK ラットの骨格筋におけるインスリン非依存性シグナル関連遺伝子発現に対する緑茶カテキンの作用」第 56 日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月、熊本

16) 井上聖哉ら、「心血管障害マーカーとしての sE-selectin に関する検討-住民健康調査の健康中年者における横断研究-」第 56 日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月、熊本

17) 今井千裕ら、「DPP-4 阻害剤または  $\alpha$ -GI の長期投与による大動脈における接着因子の遺伝子発現抑制」第 56 日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月、熊本

18) 内山弓子ら、「非肥満 2 型糖尿病モデル GK ラットの骨格筋における炎症関連遺伝子発現に対する緑茶カテキンの作用」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月、名古屋

19) 針谷夏代ら、「骨格筋における異所性脂肪細胞の特徴とインスリン抵抗性との関連」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月、

名古屋

20) 劉洋ら、「高 GI 食と低 GI 食摂取による糖質および脂質代謝指標の変動」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月、名古屋

21) 今井千裕ら、「食後血糖上昇の長期にわたる抑制は 2 型糖尿病自然発症モデル OLETF ラットにおける大血管障害発症のリスク因子の発現を低下させる」第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月、名古屋

22) 山田真実ら、「エピゲノム制御因子 Brd4 による脂肪細胞における脂肪蓄積の制御と出生後の発育との関連」第 2 回日本 DOHaD 研究会年会、2013 年 6 月、東京

23) Imai C. et al, Reduction of inflammation-related CVD risk factors in peripheral tissues by suppression of postprandial hyperglycemia in Type2 diabetic OLETF rats., IUNS 20th International Congress of Nutrition, September, 2013, Granada, Spain

〔図書〕(計 2 件)

1) 合田敏尚他、第一出版、臨床栄養のための Glycemic Index、2011、pp. 39-56

2) 合田敏尚他、シーエムシー出版、ニュートリゲノミクスとテラーメイド食品、2013、pp. 3-10

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/nutrphys/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

合田 敏尚 (GODA, Toshinao)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
研究者番号：70195923

### (2) 研究分担者

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授  
研究者番号：80423838

### (3) 研究分担者

市川 陽子 (CHIKAWA, Yoko)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授  
研究者番号：50269495