

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500857

研究課題名(和文)非肥満の耐糖能障害における病態生理の解明

研究課題名(英文)Pathophysiology of non-obese subjects with impaired glucose tolerance

研究代表者

佐藤 文彦(Sato, Fumihiko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10445538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：非肥満IGTにおける高血糖のメカニズムは完全には解明されていない。本研究においては、非肥満IGTの病態生理を検討するためにトレーサーを用いたグルコースクランプと、二つのトレーサーを用いた経口糖負荷試験を行った。私達の予備的なデータからは、非肥満IGTでは肝糖取り込みの低下と骨格筋のインスリン抵抗性が高血糖に寄与する可能性が示唆された。今後は、これらのデータを確定させるためにさらなる調査が必要である。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of hyperglycemia in non-obese IGT subjects are not fully understood. In this project, to clarify the pathophysiology in non-obese IGT, we performed glucose clamp and oral glucose tolerance test with double glucose tracer. Our preliminary result suggested that impaired hepatic glucose uptake and insulin resistance in muscle may contribute to hyperglycemia in IGT subjects. Further experiment will be required for confirming these results.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：耐糖能障害 インスリン抵抗性 インスリン分泌

1. 研究開始当初の背景

近年、日本における糖尿病や動脈硬化症の患者数の増加は著しく、早急にその予防を考える必要がある。肥満によりもたらされるインスリン抵抗性は、2型糖尿病の重要な発症因子であるだけでなく、メタボリックシンドロームの上流に位置していると考えられ、動脈硬化症進展の根本的原因として認識されてきた。しかしながら、日本で行われた大規模臨床試験である Japan Diabetes Complications Study や NIPPON DATA により糖尿病患者の平均 BMI は 23 kg/m^2 と正常レベルであること、心血管系イベントによる死亡は非肥満患者 ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$) が全体の約 80% を占めていることが明らかとなった。従って、日本人などの東洋人の糖尿病や動脈硬化症の病態を考える上で、非肥満者の病態生理学の確立が必要である。

動脈硬化症を進める因子として、食後高血糖が注目されている。DECODE, DECODA スタディーにより、2型糖尿病が発症する以前の、食後の軽度の高血糖が認められる耐糖能障害 (IGT) の時点から、動脈硬化症が進行することが明らかとなったからである。また、IGT は2型糖尿病発症の最も強い危険因子の一つであり、IGT に対する介入は予防医学上極めて重要であることは明白である。

このような背景から、食後高血糖を予防する方法を考案するために、その病態生理に関する調査が欧米で行われて来た。具体的には、グルコースに放射性同位元素でラベルしたトレーサーを用いたダブルトレーサー法や高インスリン正常血糖クランプ法にて、IGT の食後高血糖の原因の中心はインスリン抵抗性、インスリン分泌低下とそれに伴った肝臓からの過剰な糖放出であると結論された。しかしながら、このデータは「肥満・インスリン抵抗性」が病態の中心とされる欧米人の

検討であり、「非肥満・インスリン分泌低下」が病態の中心と言われて来た日本人を始めとした東洋人の病態生理と合致しているかは全く不明である。

この点に関して、近年、非肥満 IGT の病態生理はインスリン分泌低下だけでなく、インスリン抵抗性の増大も重要である可能性が指摘され、注目を集めている。

我々は、 ^1H -magnetic resonance spectroscopy (MRS) 法による肝臓、骨格筋における細胞内脂質 (異所性脂肪) の測定を10年前より行ってきており、現在までに、非肥満の2型糖尿病患者においても、骨格筋の細胞内は「肥満状態」になっており、それに伴ってインスリン抵抗性が発生していること、食事、運動といった生活習慣は、極短期間の内に全身的な肥満とは独立して細胞内脂質とインスリン抵抗性を変化させうることを明らかとした。これらのことから、日本人において非肥満であっても、異所性脂肪蓄積によりインスリン抵抗性が容易に発生しうることが示唆された。

「インスリン分泌低下」「インスリン抵抗性増大」が非肥満 IGT の病態にどのように関わっているかという問いに対しては、明確な答えは未だ無い。インスリン分泌は遺伝が大きく寄与していることが予想され、インスリン抵抗性はどちらかという生活習慣 (運動不足・過栄養) から引き起こされる異所性脂肪蓄積が原因として重要であると推測される。それぞれの対処法はその原因に直接アプローチした方が効率の良い予防に繋がると考えられるが、現状ではこれらのタイプ分けは特別に行われておらず、画一的な介入が行われて来た。本研究により、非肥満 IGT のタイプを知ることが可能となれば、IGT に対するアプローチを個別に変えることが可能になり、より効率の良い介入方法になりうる事が予想される。我々の検討により、肝臓については食事、骨格筋においては運動がそれぞ

れのインスリン抵抗性改善に有効であることを明らかとしているため、それらのデータを参考にして新たな介入方法を考案する。

2. 研究の目的

非肥満 IGT において、どのようなことが原因で高血糖が生じるのかは現在まで全く明らかにされていない。非肥満 IGT の中には、従来から考えられてきた インスリン分泌低下が中心であるタイプ、インスリン抵抗性が中心であるタイプ、その両方を持つタイプが存在することが予想されるが詳細は不明である。そこで、今回我々は、食後高血糖の原因をクランプ法等により明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 食後高血糖の原因を探索するために、同意が得られた被験者に対して、ダブルトレーサー糖負荷試験法による解析を行った。ダブルトレーサー糖負荷試験法は我が国で初めて行われる方法であり、その測定感度を preliminary に確認するために対象者は 2 型糖尿病患者を中心とした。ダブルトレーサー法による糖負荷後の糖の動態を測定する。静脈投与用として、 $[6,6-^2\text{H}_2]$ -glucose を用い、経口投与用として $[^{13}\text{C}_6]$ -glucose を用いる。前腕にトレーサー投与用の静脈を確保し、反対側の腕(手背静脈)に検体採取用の静脈を確保した。また、採血時には、腕を温めることで静脈血の動脈化をした。まず、1つめのトレーサーである $6,6-[^2\text{H}_2]$ -glucose を $[200 \times \text{fasting blood glucose (FBG)} (\text{mg/dl}) / 100 \text{ mg/m}^2 \text{ body surface area (BSA)}]$ で算出したトレーサーを静脈的に投与した後、 $2 \text{ mg/m}^2 \text{ BSA/min}$ で持続的に注入する。アイソトープ濃度を安定させるため OGTT 開始 3 時間前よりトレーサーを投与 (-180 ~ 0 min) し、アイソトープ濃度が安定

化した後、もう一つのトレーサー ($\text{U-}[^{13}\text{C}]\text{-glucose}$) を ~1% 含むブドウ糖 ($0.7 \text{ g/kg body weight}$) を経口摂取する (0 min)。トレーサー濃度、インスリン濃度、C-peptide (CPR) 濃度、グルカゴン濃度 (-180, -20, -10, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min) を測定した。

検体に対してトリクロロ酢酸を用いて除蛋白化し、p-アミノ安息香酸エチルを用いて質量分析用に誘導体化した後、高感度クロマトグラフィー [LTQ-XL-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, CA)] を用いてトレーサーのエンリッチメントを測定し、既報に基づき Ra_{Oral} 、EGP、 Rd を算出した。

2) 同意が得られた被験者に対して一次スクリーニングとして経口糖負荷試験を行い、条件を満たす症例を登録する。具体的には IGT および NGT を対象とする。その後検査前日 21 時から絶食とし以下の検査を行う。体脂肪量の測定、 $^1\text{H-MRS}$ 法による前脛骨筋・ヒラメ筋・肝臓における細胞内脂質の定量(図 1)、MRI による腹腔内脂肪・皮下脂肪量の定量を行う。その後、安定同位体 $[6,6-^2\text{H}_2]$ -glucose を用いた 2 ステップ高インスリン正常血糖クランプ検査 (インスリン注入速度 10、 $20 \text{ mU/m}^2/\text{min}$ を各 3 時間) により、肝臓、骨格筋の IR を判定した。肝臓のインスリン感受性は第 1 ステップ時の内因性糖産生抑制率で、骨格筋のインスリン感受性は第 2 ステップ時の糖消失率で評価した。

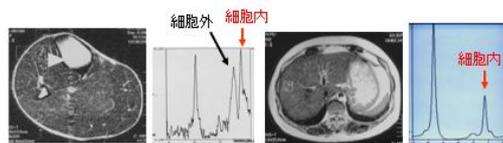


図 1 $^1\text{H-MRS}$ による骨格筋(左)、肝臓(右)の細胞内脂質測定: 細胞内脂質スペクトルの曲線下面積(AUC)を専用の定量化ソフトで算出し、内部標準(クレアチニン、水)のスペクトルの AUC により補正することにより、それぞれの細胞内脂質量を定量する。

4. 研究成果

1) 10名の2型糖尿病患者を対象にして糖負荷試験中の glucose flux をダブルトレーサー法にて測定を行った。体重当たり 0.7g のブドウ糖を負荷し、その後の血糖増加を観察した。空腹時血糖値は 140 mg/dl 程度であったが、糖負荷後 60 分～120 分で～300mg/dl 程度まで 150mg/dl 程度の血糖上昇を認めた。少数例の NGT との比較により、この血糖増悪に関連する glucose flux として経口摂取されたブドウ糖の出現率は 6mg/kg/min 程度まで高まり、それが最も重要な食後高血糖の規定因子となっていることが推測された。また、IGT に対しても数例検討を加えた結果、同様に経口摂取されたブドウ糖の出現率は 10mg/kg/min まで高まっており、2型糖尿病と同様に重要な食後高血糖の規定因子になっていることが覗えた。

2) 10名の非肥満 NGT と 9名の IGT を横断的に比較した。インスリン抵抗性については、肝臓では両群間に有意差を認めなかったが、骨格筋では IGT で NGT より約 1.5 倍インスリン感受性が高かった (NGT; 6.0 ± 2.0 mg/kg/min, IGT; 4.3 ± 1.1 mg/kg/min, $P < 0.05$)。異所性脂肪については肝臓、骨格筋共に両群間で有意差を認めなかった。糖負荷試験におけるインスリン分泌指数についても両群間で有意差を認めなかった。これらのことから、本調査においては IGT の集団は主に骨格筋のインスリン抵抗性が原因で血糖上昇が生じていることが推測された。ダブルトレーサー法の成績からは、肝糖取り込みの低下が食後高血糖の主要な要因であることが示唆された。幾つかのダブルトレーサー法を用いた研究により、ブドウ糖経口摂取後の血糖上昇の原因として、肝糖取り込みの低下が占める割合はそれぞれ、36%と 13% であることが示唆されている。しかし、他の

ダブルトレーサー法による検討では一定の見解は認めておらず、2型糖尿病において肝糖取り込みの減少が食後高血糖の原因となっているかどうかははっきり示されたとは言い難い。その一方で、IGT の食後高血糖の原因の中心はインスリン抵抗性、インスリン分泌低下とそれに伴った肝臓からの過剰な糖放出であると結論された。そのため、今回の調査で今までそれほど問題とされていなかった肝糖取り込みの低下が、日本人の IGT、DM における食後高血糖の原因である可能性が示唆された。これらの関連については、現在被験者を増やして確認を行っている。その一方でクランプ法の結果からは、骨格筋のインスリン抵抗性が IGT と関連していた。しかしながら、現在までのダブルトレーサーの検討からは、骨格筋は食後高血糖の原因となりにくいことが指摘されている。また、肝糖取り込みの程度は、今回用いたクランプ法では測定できないため、その要素については今後別個のプロトコールで測定する必要があるかもしれない。いずれにしろ、今後ダブルトレーサーの結果を併せて非肥満者 IGT における肝・筋糖代謝障害の生理学的な意義をさらに検討する必要がある。

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

佐藤 文彦 (Sato, Fumihiko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10445538