

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504012

研究課題名(和文) ピオグリタゾンの投薬量減少と副作用低減を目指した魚油併用療法の基礎的検討

研究課題名(英文) Combination therapy of fish oil and pioglitazone on the adverse effect caused by pioglitazone administration

研究代表者

松本 明世 (Matsumoto, Akiyo)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：90192343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肥満・2型糖尿病モデルのKKマウスにおいて、肥満とインスリン抵抗性における魚油とピオグリタゾンの有効性が示唆され、魚油との併用がピオグリタゾンの副作用の1つと考えられる皮下脂肪蓄積を抑制すること、脂肪細胞の炎症状態を低減できることが明らかとなった。魚油並びにピオグリタゾンの膵細胞の保護効果が確認され、併用時には、ランゲルハンス島の肥大化をより抑制できることが示された。魚油併用時、ピオグリタゾン投薬量の減少を目指した最小有効量の検討結果、雄性KKマウスにおける0.006wt%のピオグリタゾンは、インスリン抵抗性改善効果がみられなくなる境界に近い用量であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pioglitazone, a thiazolidinedione (TZD), is widely used as an insulin sensitizer in the treatment of type 2 diabetes. However, body weight gain is frequently observed in TZD-treated patients. Fish oil improves lipid metabolism dysfunction and obesity. We demonstrated that the combination of pioglitazone and fish oil may prevent the adverse effects of pioglitazone on promoting excessive body weight gain and subcutaneous fat accumulation. And, this study showed that fish oil and pioglitazone effectively prevented hypertrophy of the pancreatic islets and apoptosis-induced cell death through increased insulin sensitivity and decreased ER stress. The reduction of  $\beta$ -cell dysfunction by fish oil and pioglitazone may be led to the suppression of systemic oxidative stress because of decreased visceral fat levels.

The results suggest that the combination of pioglitazone and fish oil has particular efficacy in diabetic patients with fatty liver and adipose tissue inflammation.

研究分野：脂質栄養

キーワード：魚油 ピオグリタゾン 皮下脂肪蓄積 膵細胞 最小有効量

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームでは、肥大化した内臓脂肪細胞から放出された多量の遊離脂肪酸が、肝臓や骨格筋、膵臓などに流入し、異所性脂肪として蓄積することで、インスリン作用を阻害し耐糖能を悪化させる。したがって、内臓脂肪の蓄積は lipotoxicity (脂肪毒性) を引き起こし、全身の糖・脂質代謝障害を生じさせると考えられている。このことを踏まえ、内臓脂肪型肥満とメタボリックシンドロームの病態生理学的関わりを理解し、生体内の糖・脂質代謝に関与する制御因子に焦点を当てた治療と予防法の開発に取り組むことが重要となる。肥満・インスリン抵抗性という視点では PPAR $\alpha$  より PPAR $\gamma$  の関連性が強く、糖・脂質代謝改善作用を有する魚油と PPAR $\gamma$  アゴニストであるチアゾリジン薬の併用は、糖・脂質代謝に及ぼす相加的な改善効果はより大きいと推定される。これらのことから魚油とチアゾリジン薬の併用時の影響を検討する本研究は、肥満、インスリン抵抗性を伴う生活習慣病に対する新たな治療法の開発のために重要な基礎データとなりうると考えられる。

### 2. 研究の目的

2型糖尿病の治療に用いられている PPAR $\gamma$  アゴニストのチアゾリジン薬は、前駆脂肪細胞の分化促進による小型脂肪細胞の増加と、多量の脂肪を蓄積して肥大化した脂肪細胞に対してアポトーシスを誘導することでその数を減少させ、インスリン感作作用を有するアディポネクチンの分泌を増加させることにより、インスリン抵抗性改善作用を示す。一方、適切な食事療法と運動療法が守られない場合、増加した小型脂肪細胞に過剰な脂肪が蓄積し、脂肪組織の肥大が引き起こされやすくなると考えられている。したがって、PPAR $\gamma$  アゴニストによる薬物治療を行う上で、増加した小型脂肪細胞への脂肪蓄積を抑制できれば、食事療法と運動療法が徹底できない患者に対しても適用が可能となり、PPAR $\gamma$  アゴニストの処方設計の幅を広げることにも貢献できると考えられる。本研究は、チアゾリジン薬のピオグリタゾンに、EPA・DHA などの n-3 系多価不飽和脂肪酸が豊富な魚油を併用することで、PPAR $\gamma$  アゴニストの副作用の 1 つである、皮下脂肪の蓄積を伴う体重増加を低減できるか、さらに、併用による有益性が、PPAR $\gamma$  アゴニストの治療効果を維持したまま投薬量を減少させることができるかを明らかにすることで、糖尿病の薬物療法と魚油を用いた食事療法を併用した新しい薬物治療(処方設計)のための基礎データを提供することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 実験 1 では、魚油とピオグリタゾンの併用摂取における有効性を検討した。

EPA および DHA の供給源として DHA 濃縮魚

油(n-3系脂肪酸 30 wt%、以下「魚油」と略す)、PPAR $\gamma$  アゴニストとしてピオグリタゾンを選択し、実験動物は、肥満・2型糖尿病モデルである KK マウス(雄、7 週齢)を用いた。実験飼料は、すべて脂肪エネルギー比率を 20 とし、油脂源としてサフラワー油を調合した Con (Control) 食をコントロール食とした。Con 食にピオグリタゾンをそれぞれ 0.006 と 0.012 wt% 添加した PL 食、PH 食、これらの 3 種類の食餌の 10 en% を魚油で置き換えた、FO (Fish Oil) 食、PL/FO 食、PH/FO 食を作製した。これらの飼料を各マウスに与え、Con 群、PL 群、PH 群、FO 群、PL/FO 群、PH/FO 群の計 6 群を設け、8 週間飼育した。実験期間中の摂食量、体重、X 線 CT 解析による体脂肪量測定、組織重量、血糖値、血中ホルモン・生理活性物質(インスリン、レプチン、アディポネクチン)、血中脂質 [TG、総コレステロール(TC)、HDL-C、FFA]、臓器脂質含量(TG、TC)、糖負荷試験、インスリン負荷試験、肝臓・WAT における hematoxylin-eosin (HE) 染色、脂肪組織・膵臓の形態学的解析を行った。また、肝臓と白色脂肪組織における遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

(2) ピオグリタゾンと魚油が膵臓の機能に及ぼす影響を明らかにするため、実験 2 を行った。実験 1 と同様の Con 食、これに 0.012 wt% のピオグリタゾンを添加した P (Pioglitazone) 食、これらの食餌の 10 en% を魚油で置き換えた FO (Fish Oil) 食、P/FO 食を作製して、KK マウス(雄、7 週齢)に与え、Con 群、P 群、FO 群、P/FO 群の計 4 群を設けた。体重、X 線 CT 解析による体脂肪量測定、組織重量、血糖値、血中ホルモン、膵臓の hematoxylin-eosin (HE) 染色と TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色、画像解析ソフト(Image J)を用いて膵臓の組織学的・形態学的解析を行った。また、ランゲルハンス島の膵  $\alpha$ 、 $\beta$  細胞面積(グルカゴン・インスリン)、小胞体ストレスの評価 [C/EBP homologous protein (CHOP)] の免疫染色により評価した。

(3) 実験 3 では、実験 1、2 と同様に、Con 食、Con 食にピオグリタゾンを段階的に半分量(0.006、0.003、0.0015wt%) 添加した Con 食、0.006P、0.003P、0.0015P 食を KK マウス(雄、7 週齢) 与え、HOMA-IR をインスリン抵抗性改善効果の指標とし検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 魚油とピオグリタゾンを併用することで、魚油の肝臓の脂肪酸合成抑制作用により肝臓および脂肪組織への脂肪蓄積が抑制され、ピオグリタゾンによる皮下脂肪蓄積と体重増加が抑制できることが示された。以下、結果の詳細である。

① 摂取量及び摂取エネルギーともに群間で有意な差はなかった。インスリン抵抗性の指

標である HOMA-IR は、Con 群と比較して、ピオグリタゾンの投与により有意な低下がみられ、本研究で設定したピオグリタゾンの用量は、糖尿病の治療域にあることが示された (図 1)。実験期間中の体重増加量は、Con 群と比較して、ピオグリタゾンの単独投与群である PL 群、PH 群でそれぞれ増加する傾向がみられたが、魚油を併用した群では、Con 群レベルまで体重増加が抑制された。推定皮下脂肪量も、Con 群と比較して、それぞれ PL 群で 40%、PH 群で 57%増加したが、魚油を併用した群では増加が抑制された (図 2)。

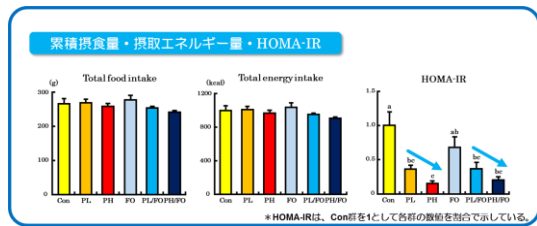


図 1 実験期間中累積摂食量及び HOMA-IR

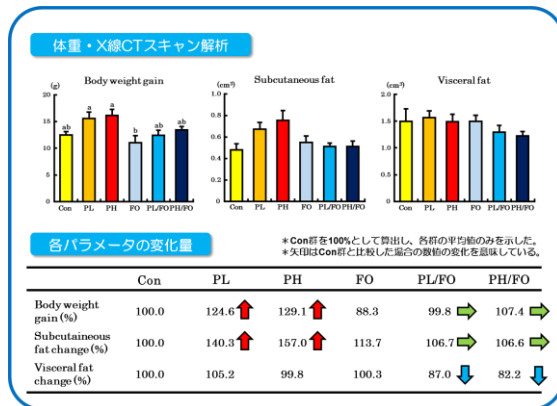


図 2 体重と X 線 CT 解析による推定腹部脂肪量

②魚油の併用が脂肪蓄積を抑制するメカニズムを確かめるために、脂質代謝の中心臓器である肝臓の外見観察や組織学的解析、肝臓中脂質の解析を行った。ピオグリタゾンの単独投与群の PL 群と PH 群の肝臓は、全体的に白みを帯びており、組織切片でも多くの脂肪滴の跡が確認できたが、魚油併用群では、これらの変化は軽減されていた。また、肝臓トリアシルグリセロール値の結果も、これらを支持する結果となった。一方で、肝臓総コレステロール値は、魚油の非摂取群と比較して、摂取群で有意に低下していた (図 3)。

このような魚油のトリアシルグリセロール低下作用は、肝臓において、脂質合成転写因子の SREBP-1c と、核内受容体である PPAR $\alpha$  を介したメカニズムによるものであると考えられていることから、ウェスタンブロット法による肝臓中のタンパク質発現およびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現の解析を行った。SREBP-1c の mRNA レベルは、Con 群と比較して、ピオグリタゾンの投与により減少した。しかし、タンパク質発現では、前駆

型の FO 群で他の群と比べて低下がみられたものの、活性型では群間で大きな変化はみられなかった。SCD1 のタンパク質発現と mRNA レベル、脂肪酸合成酵素である FAS の mRNA レベルは、Con 群と比較して、ピオグリタゾンの投与により増加したが、魚油を併用することで強く抑制された。このことから、魚油とピオグリタゾンを併用した場合は、これまでに報告されている魚油の脂肪酸合成抑制メカニズム、すなわち、脂肪酸合成系遺伝子の転写因子である SREBP-1c の発現低下を介したのではなく、魚油が転写レベルまたは翻訳レベルで脂肪酸合成酵素および脂肪酸不飽和化酵素の発現を抑制していることが示唆された (図 4)。

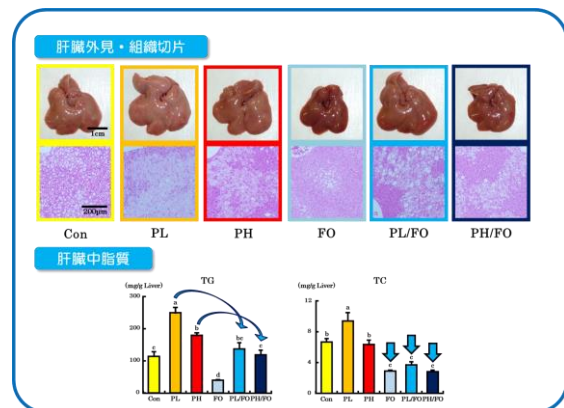


図 3 肝臓外見や組織学的解析及び肝臓中脂質

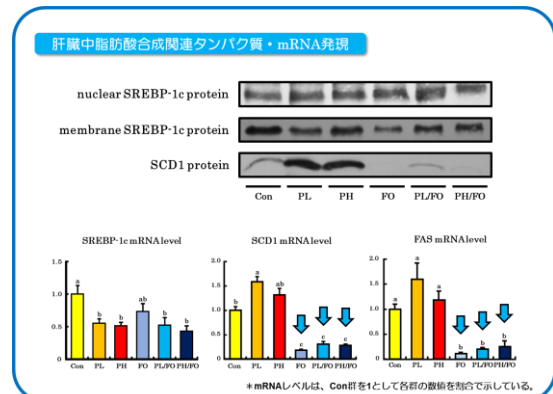


図 4 肝臓中脂質合成関連タンパク質及び mRNA 発現

③一方、肝臓の脂肪酸  $\beta$  酸化の評価を行うために、CPT1 のタンパク質発現、mRNA 発現を測定したが、両方において大きな変化はみられなかった。AOX 及び UCP2 の mRNA レベルは、Con 群と比較してピオグリタゾンの投与により増加し、ピオグリタゾンによる肝臓の脂肪酸酸化亢進は認められたが、魚油併用による影響は確認されなかった (図 5、6)。くわえて、脂肪組織の組織学的及び形態学的解析と、炎症に関する TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、MCP1 の遺伝子発現を調べた。その結果から、EPA・DHA が豊富な魚油の併用は脂肪細胞の肥大化を効果的に抑制し、炎症状態を低減できることが明らかとなった (図 7、8)。

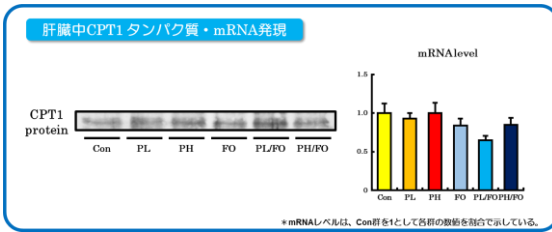


図5 肝臓中CPT1タンパク質及びmRNA発現

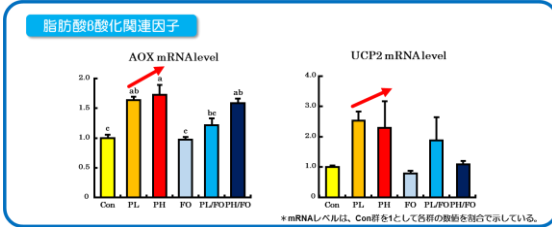


図6 肝臓中脂肪酸酸化関連因子AOX及びUCP2mRNA発現

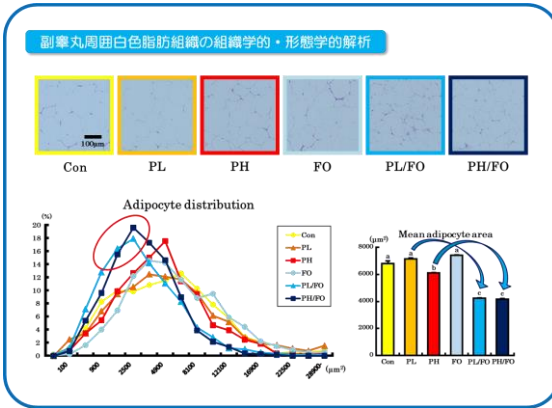


図7 脂肪組織の組織学的解析と形態学的解析

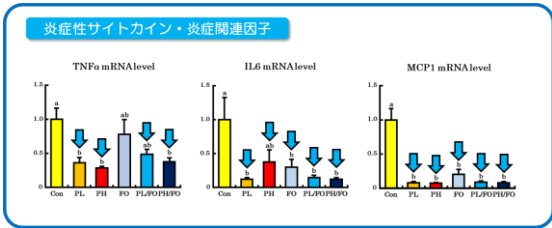


図8 脂肪組織の炎症性サイトカイン・炎症関連因子のmRNA発現

以上、実験1によって得られた成果の一部は、Toxicology Reportsにて誌上発表を行った(Iizuka, Y., et al. Toxicology Reports. 2016; 3: 4-14.)。

(2) 次に、魚油とピオグリタゾンが膵臓の機能維持に及ぼす影響を明らかにするため、実験2を行った。

①ピオグリタゾンの単独投与は、インスリン抵抗性を改善することで膵臓ランゲルハンス島の肥大化を抑制した。さらに、インスリン抵抗性に伴う膵β細胞の減少と小胞体ストレスの増加が低減されており、これまで報告されているPPARγアゴニストの膵臓機能維持効果が確認できた。一方で、魚油の投与

は、インスリン抵抗性の悪化と膵臓ランゲルハンス島の肥大化が抑制されることは無かったが、膵β細胞の減少および小胞体ストレスの低減作用と、アポトーシスの抑制作用が確認された。また、ピオグリタゾンと魚油の併用時には、それぞれの改善効果が確認されただけでなく、単独投与時と比較してランゲルハンス島のサイズが減少していた(P群68%、FO群79%、P/FO群51% vs. Con群)。これらの結果から、ピオグリタゾン並びに魚油による膵β細胞の保護効果が確認され、併用時には、よりランゲルハンス島の肥大化が抑制できることが示された(図9、10)。

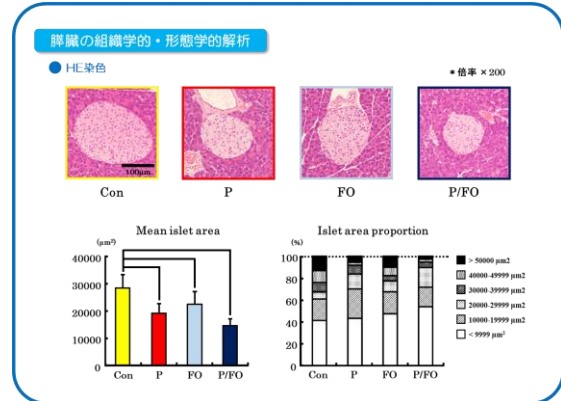


図9 膵臓の組織学的解析と形態学的解析

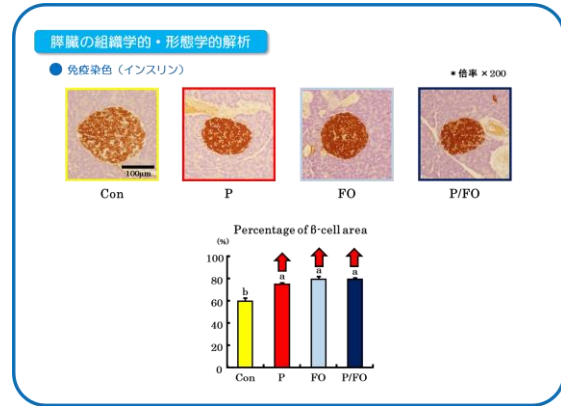


図10 膵臓の免疫染色(インスリン)とβ細胞割合

②また、ランゲルハンス島の小胞体ストレスを評価するために、小胞体ストレスにより発現が増加する転写因子であるCHOPの免疫染色を行った結果、1つのランゲルハンス島に対するCHOP陽性核の割合は、Con群と比較して、すべての群で有意に減少した。また、ランゲルハンス島のアポトーシスを評価するために、TUNEL染色を行ったところ、魚油を摂取させたFO群とP/FO群においてアポトーシス陽性細胞が検出されなかった。両者の膵臓の保護作用は、ピオグリタゾンと魚油による小胞体ストレスの低減効果と、魚油のアポトーシスの抑制効果が関与している可能性が示唆された(図11、12)。

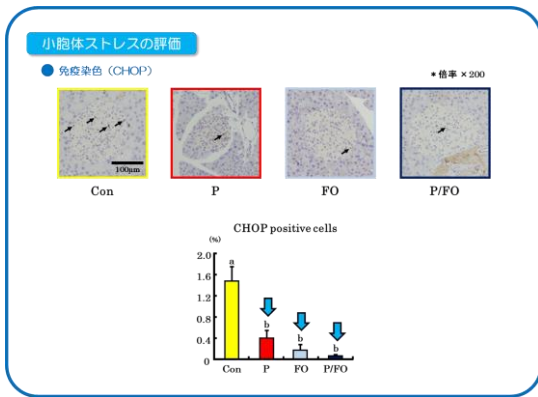


図 11 ラングレハンス島の小胞体ストレス評価

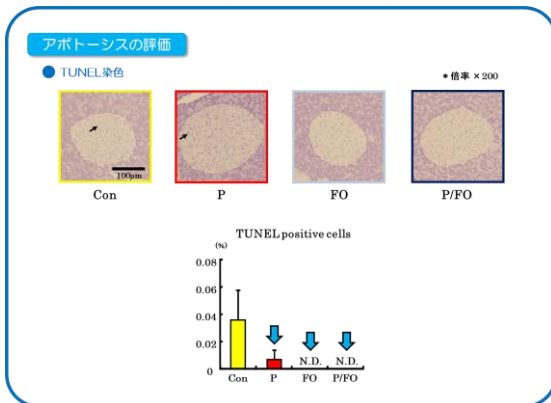


図 12 ラングレハンス島のアポトーシス評価

以上、実験 2 によって得られた成果の一部は、現在、Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids に投稿中である。

(3) ピオグリタゾン単独では有意な有効性がみられない用量において、EPA・DHA が豊富な魚油を併用することで有効性が得られることが重要となる。そこで、HOMA-IR を評価指標として、ピオグリタゾンの有意なインスリン抵抗性改善効果がみられない最大投与量を明確にすることを目的として、実験 3 を行った。その結果、0.0015P 群と 0.003P 群の HOMA-IR は、Con 群と比較して大きな変化はみられなかったため、0.0015、0.003wt% のピオグリタゾンはインスリン抵抗性改善効果がないと判断した。また、0.006P 群の HOMA-IR は、Con 群と比較して約 40% 低下したが、有意な変化ではなかった(図 13)。

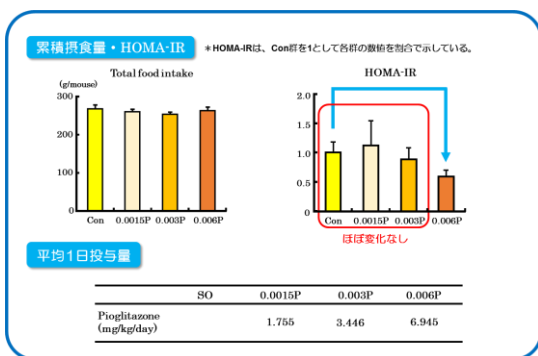


図 13 実験期間中累積摂食量及び HOMA-IR

今回を含め、これまでの実験では 0.006wt% のピオグリタゾンにより HOMA-IR が有意に低下したという結果と、低下するが有意な変化ではなかったという結果が得られており、雄性 KK マウスにおける 0.006wt% のピオグリタゾンは、インスリン抵抗性改善効果がみられなくなる境界に近い用量であることが示唆された。これらの結果は、今後の糖尿病の新たな治療法の開発のための研究において、基礎的エビデンスとして活用していく。

#### <引用文献>

①Matsuzawa, Y, Funahashi, T, Nakamura, T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. Ann N Y Acad Sci, 1999, **892**, 146-154

②Cusi, K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Curr Diab Rep, 2010, **10**, 306-315

③ Oishi, M., et al. Changes in oral antidiabetic prescriptions and improved glycemic control during the years 2002-2011 in Japan (JDDM32). J Diabetes Investig, 2014, **5**, 581-587

④Miyazaki, Y., et al. Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. Diabetes Care, 2001, **24**, 710-719

⑤ Miyazaki, Y., et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab, 2002, **87**, 2784-2791

⑥Iizuka, Y., et al. Fish oil prevents excessive accumulation of subcutaneous fat caused by an adverse effect of pioglitazone treatment and positively changes adipocytes in KK mice. Toxicology Reports, 2016, **3**, 4-14

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)  
Iizuka Y, Kim H, Nakasatomi M, Izawa T, Hirako S, Matsumoto A. Fish oil prevents excessive accumulation of subcutaneous fat caused by an adverse effect of pioglitazone treatment and positively changes adipocytes in KK mice. Toxicology Reports, 査読有、2016, **3**, 4-14

[学会発表] (計 7 件)

①飯塚讓、金賢珠、櫻井晃司、松本明世、魚油とピオグリタゾンの併用による膵臓の機能維持効果、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 13 日～5 月 15 日（兵庫）

②Iizuka Y, Kim H, Izawa T, Nakasatomi M, Matsumoto A. The combinational effects of pioglitazone and fish oil on glucose and lipid metabolism and oxidative stress in KK mice. ACN2015 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 14～18 日（横浜）

③Iizuka Y, Kim H, Izawa T, Nakasatomi M, Matsumoto A. The combinational effects of pioglitazone and fish oil on adipose tissue inflammation and oxidative stress in KK mice. Obesity Week 2014, 2014 年 11 月 2 日～7 日（ボストン、米国）

④Iizuka Y, Kim H, Izawa T, Nakasatomi M, Matsumoto A. The combination of pioglitazone and fish oil improved glucose and lipid metabolism but did not effect on oxidative stress in KK mice, 3<sup>rd</sup> International Conference on Nutraceutical and Cosmetic Sciences, 2014 年 11 月 11～12 日（東京）

⑤飯塚讓、金賢珠、井澤拓也、中里見真紀、平子哲史、松本明世、魚油とピオグリタゾンの併用が脂肪細胞の炎症と酸化ストレスに及ぼす影響、第 46 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会、2014 年 7 月 10～11 日（東京）

⑥飯塚讓、金賢珠、井澤拓也、中里見真紀、松本明世、EPA・DHA の併用によるピオグリタゾンの副作用低減の可能性、第 34 回 埼玉医療薬学懇話会、2014 年 7 月 6 日（埼玉）

⑦飯塚讓、金賢珠、井澤拓也、松本明世、魚油とピオグリタゾンの併用による脂肪細胞の小型化と炎症状態の改善、第 68 回 日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 30 日～6 月 1 日（北海道）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 明世 (MATSUMOTO, Akiyo)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：90192343

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：