

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350118

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおける機能性食品のインクレチン分泌促進効果の検討

研究課題名(英文)Study of functional foods as incretin effects for metabolic syndrome

研究代表者

根岸 裕子 (Negishi, Hiroko)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：50523841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究より、メタボリックシンドローム関連疾患発症・進展にインクレチンが関与している可能性を示す結果が得られた。GLP-1だけではなく、GLP-1を介さないDPP-4によるメタボリックシンドローム関連疾患への関与が示唆された。さらに、酒粕などの食品・植物由来成分について、メタボリックシンドローム関連疾患の進展抑制を有する食品・植物由来成分が明らかとなり、そのうちインクレチンを介した作用を有する物質が明らかとなった。

今後、メタボリックシンドローム関連疾患に対し、GLP-1だけではなく、DPP-4阻害作用にも注目し、ヒトへの有効な機能性食品探索を実施することが重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：SHRSP.Z-Lepr fa /IzmDmcr rats (SPZF) show hypertension, hyperphagia, obesity, dyslipidemia, and insulin resistance. Many reports have suggested that glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) affect various organs. We observed the expression of GLP-1 and DPP-4 in SPZF rats. In this study, we have shown the effects of incretin may relate to the phenotype in metabolic syndrome status in SPZF.

There are many reports that natural products have numerous health benefits, including protection against cardiovascular disease. Treatment with sake lees significantly increased the GLP-1 receptor expression than in control. Serum active GLP-1 level in peptide fraction of sake lees group was significantly increased than in control. Sake lees attenuated the development of renal damage through GLP-1 and antioxidant activities in SHRSP.

Further studies are needed in order to clarify the effects of the functional foods through the incretin

研究分野：食品機能学

キーワード：メタボリックシンドローム インクレチン GLP-1 DPP-4 植物由来成分 肥満 腎障害

1. 研究開始当初の背景

戦後、生活習慣の欧米化を反映した内臓脂肪の蓄積を基盤に、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧の発症が増加している。そして、これらの症状を集積し、動脈硬化性疾患の危険因子を助長する病態を“メタボリックシンドローム”という。メタボリックシンドロームに着目する意義は、日本をはじめ多くの国で死因の上位を占める心血管疾患、脳血管疾患の発症リスクが高くなること、死因だけではなく超高齢化を迎える多くの国で課題となっている認知症や寝たきりの原因疾患に脳血管疾患が深く関わっていること、そして何より生活習慣の改善によりこれら疾患の予防が可能ということがあげられる。また、メタボリックシンドローム関連疾患を予防することにより、現在問題となっている医療費の大幅な削減にもつながっていくことが期待される。

近年消化管から分泌されるホルモンであるインクレチンの GLP-1 を活用した薬が糖尿病薬として開発され、臨床の場で広く用いられている。さらに、インクレチンは血糖調節機能だけではなく、様々な臓器にて GLP-1 受容体発現が認められることから、他の機能の可能性について注目を集めている。例えば、脳、胃、腎臓、心臓、血管など様々な臓器への作用の可能性が報告されており、メタボリックシンドロームモデルラットにおけるインクレチン動態についても興味を持たれる。

2. 研究の目的

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) と同程度の重篤な高血圧と、レプチン受容体遺伝子変異を有する Zucker fatty (ZF) ラットと同程度の高度肥満および高脂血症、高インスリン血症などを呈しており、メタボリックシンドローム解析に有用なモデル動物である SHRSP.Z-Leprfa/IzmDmcr (SP・ZF) を用い、各種臓器におけるインクレチン受容体タンパク発現、遺伝子発現について解析を行うとともに、植物由来成分によるメタボリックシンドローム関連因子、インクレチン分泌への作用を分析することにより、メタボリックシンドローム一次予防のメカニズムを検討し、ヒトへの有効な機能性食品探索の基礎的検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)メタボリックシンドロームモデルラットにおけるインクレチンの作用

12 週雄性メタボリックシンドロームモデルラット (SP・ZF)、その非肥満同腹仔 (Lean)、肥満モデルラット (ZF) および正常血圧ラット (WKY) を各 6 匹、計 24 匹用いた。体重及び血圧、心拍を測定した後 24 時間尿を採取し、15 時間絶食、麻酔下で採血後、腎臓を採取した。24 時間尿中、血中各種指標を測定し

た。各臓器中 GLP-1 受容体 (GLP-1R) タンパク発現量を Western blot 法により、DPP-4mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で分析した。

(2)メタボリックシンドロームモデルラットにおける植物由来成分のインクレチンへの影響

6 週齢雄性メタボリックシンドロームモデルラット (SP・ZF) を 1 週間馴化後、コントロール群 (Ctrl)、マリアアザミに含まれるシリビニンを低濃度 (100mg/kg/day) 投与した群 (L Sili)、高シリビニン投与 (300mg/kg/day) 群 (H Sili)、メトホルミン投与 (150mg/kg/day) 群 (Met) の各 5 匹、計 20 匹を用い、5 週間経口投与した。投与期間中、毎週体重測定、血圧測定を実施し、終了時に 15 時間絶食し、麻酔下で採血後、血中および尿中各種指標測定、腎臓を採取した。腎臓では各種タンパク発現を Western blot 法で、mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で分析した。

(3)高血圧モデルラットにおける植物由来成分のインクレチンへの影響

酒粕の影響

5 週齢雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP/Izm) を 1 週間馴化後に以下の 3 群に分けた。コントロール群 (C)、酒粕群 (S)、酒粕ペプチド群 (P) の各 5 匹を用い、毎週体重・血圧測定をおこない、負荷 12 週目に、絶食下 24 時間採尿後、麻酔科にて採血、解剖を行い、腎臓では各種タンパク発現を Western blot 法にて分析を行った。

Angelica acutiloba Kitagawa (大和当帰) の影響

5 週齢雄性 SHRSP/Izm を 1 週間馴化後、コントロールとして水飲水群 (Control)、大和トウキ水抽出物 (200mg/Kg 体重/日) 含有飲水群 (Yamato Toki W)、大和トウキ 50% エタノール抽出物 (200mg/Kg 体重/日) 含有飲水群 (Yamato Toki E) の 3 群に分け、各群 6 匹に 6 週間飲水投与を実施した。投与期間中、毎週体重測定、血圧測定を実施し、終了時に 24 時間採尿、麻酔下で採血後、血中および尿中各種指標を測定した。

統計解析

データは平均値 ± 標準誤差で表し、各群の平均値の比較を一元配置分散分析で解析し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

なお、本研究におけるすべての動物実験に関しては、武庫川女子大学動物実験委員会の承認を得た上で行った。

4. 研究成果

(1)メタボリックシンドロームモデルラットにおけるインクレチンの作用

SP・ZFにおいて、ZFよりも肥満の程度が軽いにも関わらず脂肪重量の亢進およびトリグリセライドが高値を示し、さらに尿中へのアルブミン漏出がみられ、腎障害の亢進が明らかとなった。

抗酸化酵素であるカタラーゼの腎臓中タンパク発現がSP・ZFにおいてWKYより有意に低値を示していることから、酸化ストレス抑制作用が减弱し、腎障害に一部関与しているものと示唆された。

また、肝臓、心臓におけるGLP-1タンパク発現量を検討した結果、肝臓ではWKYと比べLean、SP・ZFで有意に高値を示し(図1)心臓では、WKYと比べZF、Lean、SPZFで有意に低値を示した(図2)。

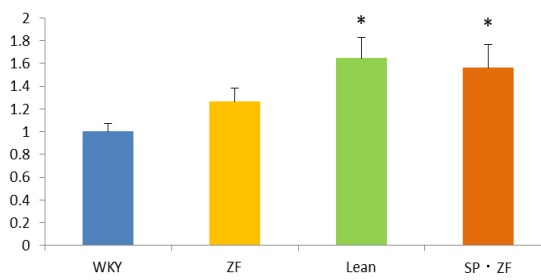


図1 肝臓中GLP-1Rタンパク発現量

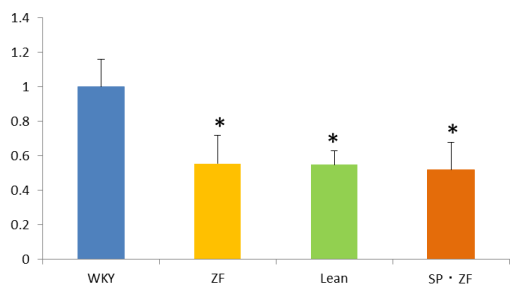


図2 心臓中GLP-1Rタンパク発現量

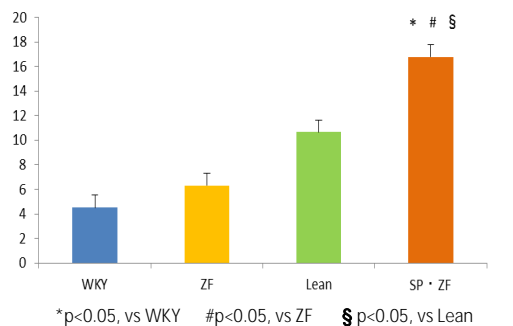


図3 血清活性型GLP-1 (pg/mL)

さらに、重篤な腎障害が認められたSP・ZFにおいて、血清活性型GLP-1が高値を示

していた(図3)。しかし、腎臓中GLP-1Rタンパク発現量について各系統における有意な差は認められなかった。

以上のことより、GLP-1がメタボリックシンドロームモデルラットにおける病態発症・進展へ関与している可能性は推察されたが、臓器中でのGLP-1Rタンパク発現の結果より、関与は直接的ではない可能性が推測されたため、インクレチンを分解する酵素として知られるDPP-4についても検討を行った。

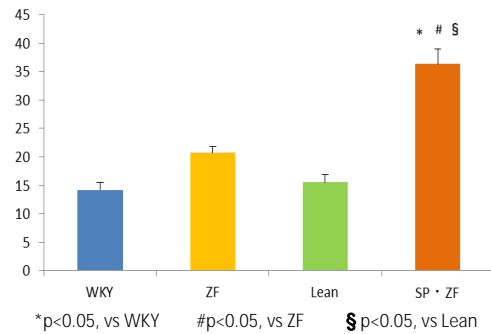


図4 血清DPP-4活性 (pmol/min/ml)

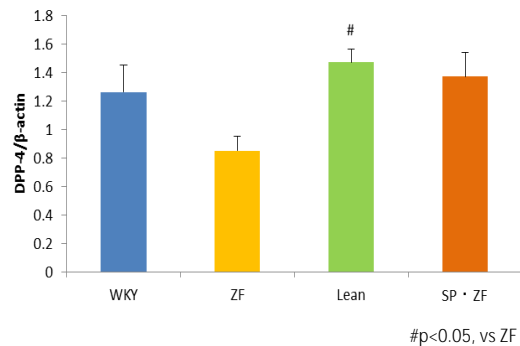


図5 腎臓中DPP-4mRNA発現

血清中DPP-4活性がSP・ZFにおいて高値を示しており(図4)腎臓中DPP-4 mRNA発現量がLeanとSP・ZFにおいて高値傾向であった(図5)。

これまでにKoredaら(BBRC 2013)や、Nistala (Obesity 2014)は、DPP-4阻害薬による腎障害抑制を報告していることから、腎障害へのDPP-4の関与が示唆されており、本研究におけるSP・ZFの腎障害の亢進にもDPP-4の活性亢進が一部関与していると思

唆された。また、肥満へのインクレチンの関与について、GIPは脂肪細胞への直接作用により、脂肪蓄積を促進することが報告されている。またGLP-1は、食欲抑制作用により体重増加抑制作用を有すると報告されている。そこで、インクレチン分解酵素、DPP-4について、内臓脂肪細胞の一つ、腸間膜脂肪における

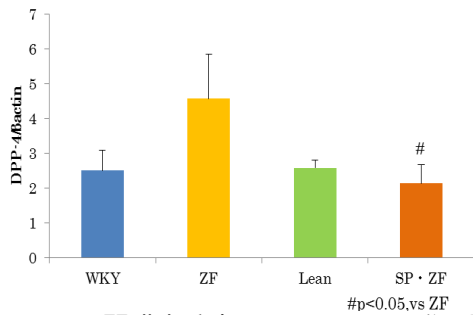


図6 腸間膜脂肪中 DPP-4mRNA 発現量

mRNA 発現量を分析した。

その結果、肥満モデルである ZF について発現亢進が認められたが、同様に肥満を呈すメタボリックシンドロームモデル動物、SP・ZF については、痩せ型あるいは正常体重ラットとの差は認められなかった(図6)。また、摂食量と血中 DPP-4 活性や血中活性型 GLP-1 との間に相関関係は認められなかった。

メタボリックシンドロームモデルラットは、ヒトと同様に、複雑な病態を呈しており、本モデルにおける肥満とインクレチンとの関係については、さらなる検討が必要である。

(2)メタボリックシンドロームモデルラットにおける植物由来成分のインクレチンへの影響

シリビニン投与により血圧上昇抑制作用が認められ、十二指腸における GLP-1R タンパク発現量は、高値傾向であったが、血漿中活性型 GLP-1 は有意な差は認められなかった。シリビニン投与における本研究での GLP-1 の直接的関与は低いと考えられた。一方、血清 DPP-4 活性の低下傾向が認められた(図7)。

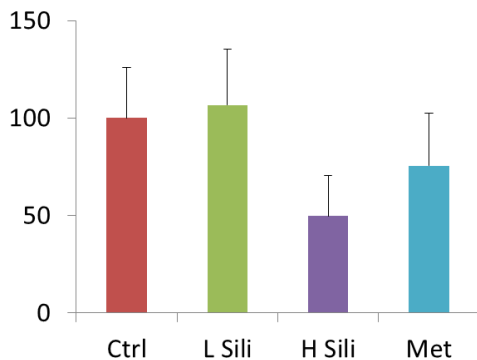


図7 シリビニン投与による血清 DPP-4 活性

Zhang T. (*J Hum Hypertens*, 2015) による疫学調査によると、血中 DPP-4 活性が高い群において、血圧が高値を示すという報告がなされており、本研究におけるシリビニンによる DPP-4 活性の減弱が血圧上昇抑制作用に一部関与している可能性が示唆さ

れた。

(3)高血圧モデルラットにおける植物由来成分のインクレチンへの影響

酒粕の影響

摂食量は実験期間中、全ての群間で有意差はみられず、体重についても各群で差は見られなかった。収縮期血圧と平均動脈圧において、負荷開始 9 週目に酒粕ペプチド (P) 群がコントロール (C) 群に対し有意に低値を示した(図8)。その後も抑制傾向が認められたことから、酒粕ペプチドの血圧上昇抑制効果が明らかとなった。

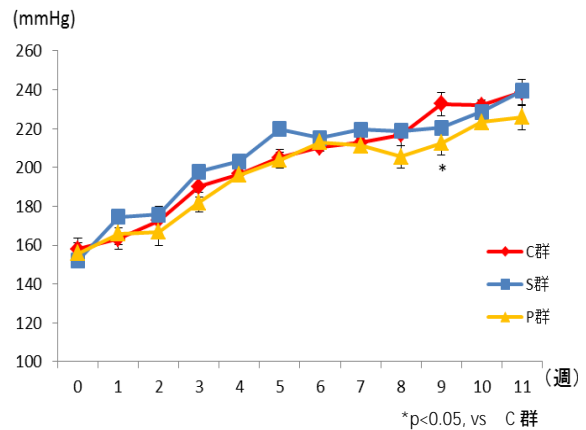


図8 酒粕投与による血圧上昇抑制効果

血清活性型 GLP-1 は P 群で有意に増加、酒粕群で増加傾向がみられた(図9)。GLP1-R は腎皮質・髄質共に S 群で有意に増加、P 群で増加傾向がみられた(図10)。さらに、腎皮質において AT1R が S 群、P 群ともに C 群に対し、有意に低値を示した

また炎症性について、血中 MCP-1、IL-6 に差は見られなかったものの、TNF は、P 群において有意に抑制されていた。酸化ストレス関連では、血清 TBARS が P 群において有意に低値を示した

以上の結果より、酒粕による血圧上昇抑制作用が認められ、抗炎症、抗酸化作用を介したものであることが示唆された。さらに、酒粕ペプチドによるインクレチンを介した腎

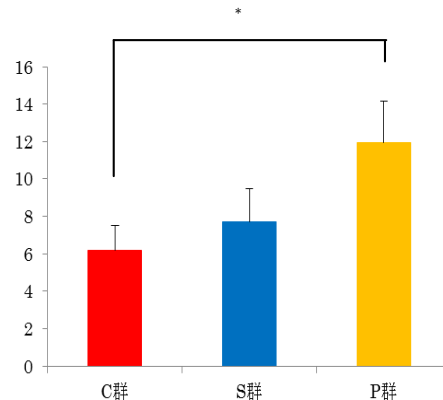


図9 酒粕投与による血中活性型 GLP-1

臓でのレニン・アンジオテンシン系抑制及び抗酸化作用による保護作用の可能性が示唆された。

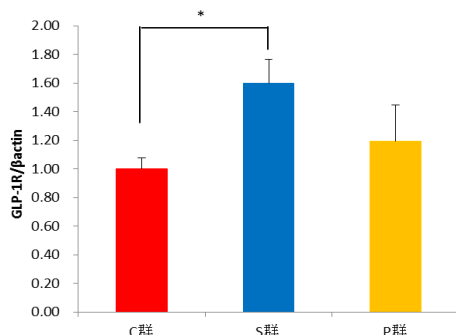


図 10 酒粕投与による腎皮質中 GLP-1R タンパク発現量

Angelica acutiloba Kitagawa (大和当帰) の影響

血清グルコースは、Control 群に対し、Yamato Toki E 群において低値を示した。血漿インスリン、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR について、Yamato Toki W 群において、有意な低値を示し、Yamato Toki E 群も低値傾向であった。このことから、大和トウキ抽出物により、糖代謝改善作用が明らかとなった。

大和トウキ抽出物による体重変化、血圧上昇抑制作用、腎障害抑制作用など認められなかった。しかし、体重 100g あたりの内臓脂肪については、後腹膜脂肪 (Ret)、腸間膜脂肪 (Mes)、副睾丸周囲脂肪 (Epi) いずれにおいても、Control 群に対し、Yamato Toki E 群が有意に低値を示した。また、Mes については、Yamato Toki W 群においても、Control 群に対し、有意に低値を示した (図 11)。

また、血清クレアチニン濃度が、コントロール群に対し、大和トウキ 50%エタノール抽出物含有飲水群が有意に高値を示したことから、クレアチニンクリアランスにおいて、差は認められなかったことから、腎機能低下による血清クレアチニン濃度上昇とは考えにくく、筋肉量を反映していると推察された。

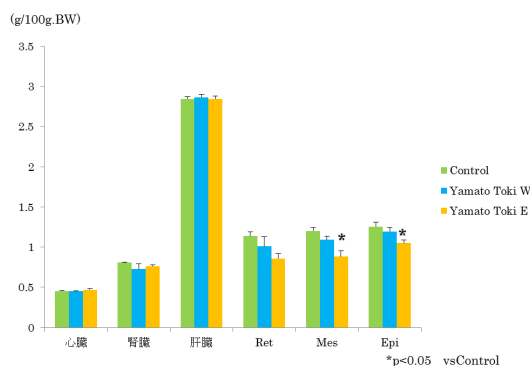


図 11 Angelica acutiloba Kitagawa 投与による臓器湿重量

以上のことから、大和トウキ抽出物、特に 50%エタノール抽出物により、内臓脂肪の低下および筋肉量の増加の可能性が示唆された。

血漿活性型 GLP-1 は、Yamato Toki E 群が高値傾向であるものの有意な差は認められなかった。

大和トウキによる血糖値低下、インスリン抵抗性改善作用が示唆され、さらに、内臓脂肪も減少しており、抗肥満作用等を有する可能性も考えられ、その作用機序に興味を持たれるが、インクレチンの関与は低いと考えられた。

本研究より、メタボリックシンドローム関連疾患発症・進展にインクレチンが関与している可能性を示す結果が得られた。また、当初インクレチンの一つ、GLP-1 に注目し、検討をしていたが、本実験より GLP-1 を介さない DPP-4 によるメタボリックシンドローム関連疾患への関与が示唆された。さらに、数種の食品および植物由来成分について、メタボリックシンドローム関連疾患モデル動物を用い検討した結果、関連疾患の進展抑制を有する食品・植物由来成分が明らかとなり、そのうちインクレチンを介した作用を有する物質が明らかとなった。今後、メタボリックシンドローム関連疾患に対し、GLP-1 だけではなく、DPP-4 阻害作用にも注目し、ヒトへの有効な機能性食品探索を実施することが重要であると考えられた。

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 7 件)

Negishi H, Sugahama S, Kawakami A, Kondo J, Nishigaki Y, Yoshikawa M, Ueyama T, Ikeda K. Effect of *Angelica acutiloba* Extract on Blood flow Regulation in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Natural Product Communications*, 査読有、11(10)、2016、1497-1498
家森幸男、根岸裕子、森真理、良き長寿食文化を世界へ、査読無 (総説) 日本ポリフェノール学会雑誌、2016、5(1)、6-14

Kishimoto A, Dong S, Negishi H, Yasui N, Sun JN, Ikeda K, Effects of Berberine on Adipose Tissues and Kidney Function in 3T3-L1 Cells and Spontaneously Hypertensive Rats. *Natural Product Communications*, 査読有、10(9)、2015、1543-1546

Kazuo Yamagata, Motoki Tagami, Yukio Yamori. Dietary polyphenols regulate endothelial function and

prevent cardiovascular disease. *Nutrition*, 査読有、31(1)、2015、28-37
Nishimura Y, Mabuchi K, Taguchi S, Ikeda S, Aida E, Negishi H, Takamata A Involvement of orexin-A neurons but not melanin-concentrating hormone neurons in the short-term regulation of food intake in rats. *J. Physiol. Sci.* 査読有、64(3)、2014、203-11
Dong S, Yasui N, Negishi H, Kishimoto A, Sun JN, Ikeda K. Increased oxidative stress in 3T3-L1 cells was attenuated by berberine treatment. *Natural Product Communications*, 査読有、10(6)、2014、895-897
池田克巳、根岸裕子、緑茶カテキンの血圧上昇抑制作用、査読無（総説）、*Functional Food*, 8(1)、2014、21-26

〔学会発表〕(計 5 件)

菅濱紗里、根岸裕子、河上綾香、続繁星、安井菜穂美、池島 喬、池田克巳、メタボリックシンドロームモデルラットにおけるシリピニンの効果、第 39 回日本高血圧学会総会、2016、9/30-10/2、仙台国際センター(宮城県仙台市)

Sugahama S, Negishi H, Kawakami A, Tsukuma R, Yasui N, Ikeda K The expression of glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase-4 in SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr rats 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2016, 9/24-29, ソウル、韓国

菅濱紗里、根岸裕子、安井菜穂美、家森幸男、池田克巳、肥満・高血圧ラット (SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr) の腎障害における GLP-1 の影響 第 38 回日本高血圧学会総会、2015、10/9-11、愛媛県民文化会館(愛媛県松山市)

岸本亜野、根岸裕子、安井菜穂美、家森幸男、池田克巳、Berberine 投与による高血圧発症ラットの内臓脂肪および腎臓への影響、第 38 回日本高血圧学会総会、2015、10/9-11、愛媛県民文化会館(愛媛県松山市)

根岸裕子、安井菜穂美、奈良安雄、家森幸男、池田克巳、GLP-1 亢進を介した酒粕由来 ACE 阻害ペプチドの血圧上昇抑制及び腎保護作用、第 37 回日本高血圧学会総会、2014、10/17-19、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 裕子 (Negishi Hiroko)
武庫川女子大学・薬学部・助教
研究者番号：50523841

(2) 研究分担者

鷹股 亮 (Takamata Akira)
奈良女子大学・生活環境科学系・教授
研究者番号：00264755

山形 一雄 (Yamagata Kazuo)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：10299323

池田 克巳 (Ikeda Katsumi)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号：80273499