

2012年度 修士論文

長期的な無糖質食摂取がラットの糖代謝能に及ぼす影響

**Effects of long-term feeding of carbohydrate-free diets
on glucose metabolism in rats**

早稲田大学 大学院スポーツ科学研究科
スポーツ科学専攻 身体運動科学研究領域

5011A049-4

谷口 祐一

Hirokazu Taniguchi

研究指導教員： 樋口 満 教授

目次

第1章 緒言	1
第2章 文献研究	3
I. 糖質制限食が身体組成および糖代謝能に及ぼす影響	3
1. 糖質制限食が体重および体脂肪量に及ぼす影響	3
2. 糖質制限食が糖代謝能に及ぼす影響	4
II. 糖代謝能に関わる糖代謝関連分子	7
1. 骨格筋および脂肪組織の糖輸送体 GLUT4 が糖代謝能に及ぼす影響	7
2. 腸管における糖輸送体 GLUT-2 が糖代謝能に及ぼす影響	10
III. 糖代謝能に影響を及ぼす要因	11
1. 内臓脂肪量が糖代謝能に及ぼす影響	11
2. 骨格筋トリグリセリド含量が糖代謝能に及ぼす影響	13
3. 肝臓トリグリセリド含量が糖代謝能に及ぼす影響	14
4. 血中遊離脂肪酸濃度が糖代謝能に及ぼす影響	14
第3章 研究課題	18
課題1 無糖質食がラットの糖代謝能に及ぼす影響 -自由摂食条件による検討-	18
I. 目的	18
II. 方法	18
1. 実験動物および飼育条件	18
2. 経口糖負荷試験 (OGTT)	20
3. 組織の摘出および保存	20
4. 分析方法	20
(1) 血液生化学的項目	20
i) 血漿グルコース濃度の測定	20
ii) 血漿インスリン濃度の測定	21
iii) 血漿遊離脂肪酸濃度の測定	21
iv) 血漿トリグリセリド濃度の測定	22
v) インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) の算出	22

vi) グルコース曲線下面積およびインスリン曲線下面積の算出	23
(2) 骨格筋および副睾丸脂肪における GLUT-4 および空腸の GLUT-2 含量の測定	23
i) ホモジナイズおよびホモジネートの調整	23
ii) 電気泳動用サンプルの調整	24
iii) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	24
iv) ウェスタンブロッティング	24
(3) 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量の測定	25
(4) 骨格筋および肝臓トリグリセリド含量の測定	26
(5) 統計処理	26
III. 結果	28
1. 体重、各臓器重量、摂餌量、飼料効率	28
2. 血液生化学的項目	28
(1) 空腹時血漿グルコース、インスリン濃度および HOMA-IR	28
(2) 空腹時血漿トリグリセライドおよび遊離脂肪酸濃度	29
(3) OGTT における血漿グルコース濃度および曲線下面積	29
(4) OGTT における血漿インスリン濃度および曲線下面積	29
3. 骨格筋 GLUT-4、副睾丸脂肪 GLUT-4 および空腸 GLUT-2 含量	29
(1) 骨格筋 GLUT-4 含量	29
(2) 副睾丸脂肪 GLUT-4 含量	30
(3) 空腸 GLUT-2 含量	30
4. 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量	30
5. 骨格筋および肝臓トリグリセライド含量	30
課題 2 無糖質食がラットの糖代謝能に及ぼす影響 -ペアフィーディング条件による検討-	40
I. 目的	40
II. 方法	40
1. 実験動物および飼育条件	40
2. 経口糖負荷試験 (OGTT)	41
3. 組織の摘出および保存	41
4. 分析方法	41
(1) 血液生化学的項目	41

(2) 骨格筋 GLUT-4、副睪丸脂肪 GLUT-4 および空腸 GLUT-2 含量の測定	・・・ 41
(3) 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量の測定	・・・ 41
(4) 骨格筋および肝臓トリグリセリド含量の測定	・・・ 42
(5) 統計処理	・・・ 42
III. 結果	・・・ 42
1. 体重、各臓器重量、摂餌量、飼料効率	・・・ 42
2. 血液生化学的項目	・・・ 43
(1) 空腹時血漿グルコース、インスリン濃度および HOMA-IR	・・・ 43
(2) 血漿遊離脂肪酸およびトリグリセライド濃度	・・・ 43
(3) OGTT における血漿グルコース濃度および曲線下面積	・・・ 43
(4) OGTT における血漿インスリン濃度および曲線下面積	・・・ 43
3. 骨格筋 GLUT-4、副睪丸脂肪 GLUT-4 および空腸 GLUT-2 含量	・・・ 44
(1) 骨格筋 GLUT-4 含量	・・・ 44
(2) 副睪丸脂肪 GLUT-4 含量	・・・ 44
(3) 空腸 GLUT-2 含量	・・・ 44
4. 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量	・・・ 44
5. 骨格筋および肝臓トリグリセライド含量	・・・ 44
IV 考察	・・・ 54
第 5 章 まとめ	・・・ 63
I. 研究目的	・・・ 63
II. 結果	・・・ 63
III. 今後の課題	・・・ 63
引用・参考文献一覧	・・・ 64
謝辞	・・・ 80

第1章 緒言

近年、2型糖尿病患者の増加が世界的な社会問題となっている (Wild S, 2004)。この2型糖尿病の発症には、肥満による内臓脂肪の過剰蓄積が関与していると考えられている (Kissebah AH, 1991)。内臓脂肪からは様々な生理活性物質(アディポサイトカイン)が分泌されることが知られているが、内臓脂肪の過剰蓄積はこの分泌動態に影響を及ぼし、糖代謝能を低下させる Tumor Necrosis Factor (TNF) α 、Monocyte Chemoattractant Protein (MCP) -1、レジスチンおよび遊離脂肪酸などの血中濃度を増加させる一方で、糖代謝能を向上させるアディポネクチンの血中濃度の減少につながる (Matsuzawa Y, 2008)。その結果、骨格筋や脂肪組織などの臓器において、インスリン抵抗性が引き起こされる。このように、内臓脂肪量の増加は全身の糖代謝能を悪化させるため、運動療法や食事療法など様々な手段によって内臓脂肪量の蓄積を予防もしくは減少させることが、糖代謝能を維持・増進させるうえで重要であると考えられている。

内臓脂肪量を減少させる代表的な食事療法として、摂取エネルギー量の制限(カロリー制限)などが良く知られているが、近年新たな食事療法として、糖質制限食が注目を集めている。これは、強い体脂肪合成作用を持つインスリンの分泌を促す糖質の摂取量を極力減らす、という手法である。Marsset-Baglieri A (2004) は、実験動物(ラット)を用いた実験において、糖質を全く摂取しない無糖質食群の腹腔内脂肪量が普通食群(糖質エネルギー比 60%程度)と比較して有意に低くなることを報告している。さらに、Koide N (2007) の研究においては、糖質エネルギー比を 30%程度にした糖質制限食においても、ラットの腹腔内脂肪量が有意に低下することが示されており、軽度の糖質制限でも腹腔内脂肪量の減少効果が得られる可能性が示唆されている。

一方、ヒトでは糖質エネルギー比を 10%以下にした厳しい糖質制限食を用いた時のみ、普通食と比較して有意な体脂肪量の減少が認められており (Brinkworth GD, 2009 および JS Volek, 2004)、それよりも軽度な糖質制限食の場合には、普通食と比較して

有意な差がみられないことが示されている (Sacks SM, 2009 および Clifton Pm, 2008)。従って、ヒトにおいては、内臓脂肪量の蓄積を予防もしくは減少させるためには、動物よりも厳しい糖質制限が必要であると考えられている。

以上のように、ヒトにおいて体脂肪および内臓脂肪の減少効果を得るためには厳しい糖質制限が必要であると考えられているが、このような食事を長期間にわたって摂取した場合には、内臓脂肪が減少するものの、糖代謝能はむしろ悪化する可能性も考えられる。先行研究において、ストレプトゾトシン (Streptozotocin, STZ) の投与により膵臓の β 細胞が破壊され、インスリン分泌能が著しく低下したラットでは、血糖を細胞内へと取り込む際に重要な役割を果たしている糖輸送体 GLUT-4 が、骨格筋および脂肪組織において減少することが報告されている (Kawanaka K, 1996 および Begum N, 1992)。これらの結果は、GLUT-4 の発現量さらには糖代謝能を維持するためには、インスリン分泌を維持することが必要であることを示唆している。従って、厳しい糖質制限を行い、長期間にわたってインスリン分泌が少ない状態が続くことは、内臓脂肪を減少させるものの、骨格筋および脂肪組織の GLUT-4 の発現量の低下などを介して、全身の糖代謝能に悪影響を及ぼす可能性があると考えられる。

そこで本研究は、厳しい糖質制限が全身の糖代謝能に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、糖質を最大限に制限した無糖質食を長期的摂取させたラットにおける耐糖能を評価することとした。さらに無糖質食を長期間摂取したラットの骨格筋および脂肪組織などにおける糖代謝関連分子群の発現量を分析することで、その効果のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

第2章 文献研究

本章では、まず、糖質制限食が身体組成および糖代謝能へ与える影響に関してこれまでに報告されている知見をまとめることとする。合わせて、骨格筋などに発現している糖代謝関連分子や、糖代謝に影響を及ぼす要因について述べる。

I. 糖質制限食が身体組成および糖代謝能に及ぼす影響

1. 糖質制限食が体重および体脂肪量に及ぼす影響

糖質摂取により膵臓から分泌されるインスリンが、強い体脂肪合成促進作用を持つことが知られているため (Klemm DJ, 2001)、糖質制限食が体脂肪の蓄積に及ぼす影響に関する研究はこれまでに数多く行われている。緒言で述べた Marsset-Baglieri A (2004) と同様に、Schmid H (1984) は、普通食 (タンパク質エネルギー比 17%、脂質エネルギー比 18%および糖質エネルギー比 65%) 群と比較して、高タンパク・無糖質 (タンパク質エネルギー比 80%、脂質エネルギー比 20%) を 30~40 日間給餌したラットでは、体重および腹腔内脂肪量が有意に少なかったことを報告している。この研究では、自由摂食条件としたために摂餌量に差が生じていたものの、高タンパク質・無糖質食群と普通食群の摂餌量を同等にしたラット (Jean C, 2001) においても腹腔内脂肪が有意に低くなることが認められていることから、無糖質食による厳しい糖質制限は、腹腔内脂肪の蓄積を抑制する効果があると考えられる。この効果は、マウス (Klaus S, 2005) および糖尿病モデルラット (Koide N, 2007) などを用いた動物実験において、糖質エネルギー比を 30%程度にした高タンパク・低糖質食条件下で行われた研究においても認められており、糖質制限による体重および体脂肪蓄積抑制効果は、動物実験において広く認められている。

ヒトを対象とした低糖質食 (糖質エネルギー比 23~45%) を用いた先行研究でも、肥満者および 2 型糖尿病患者において体脂肪量が有意に減少することが報告されている

(Dyson PA, 2007 および Skov AR, 1999)。しかしながら、これらの実験においては、動物実験と同様に糖質制限群において摂取エネルギー量が低下していることから、糖質制限ではなく、カロリー制限の影響によって体脂肪量が減少した可能性が考えられる。これに対して、普通食群との間に摂取エネルギー量の有意な差が認められていない先行研究では、低糖質食群において体脂肪量が有意に減少したこと (Brinkworth GD, 2009 および Volek JS, 2004) が報告されている一方で、コントロール群と低糖質食群 (糖質エネルギー比 25~46%) との間に有意な差がないという先行研究も多数報告されている (Kerksick CM, 2010、Clifton PM, 2008、Brinkworth GD, 2004 および Baba NH, 1999)。これらの報告から、軽度な糖質制限による体脂肪量の蓄積抑制効果が動物実験において広く認められている一方で、ヒトにおいては一致した見解が得られていない。しかし興味深いことに、同じ摂取エネルギーにおいて体脂肪量の減少がみられた Brinkworth GD (2009) および Volek JS (2004) の報告では、糖質エネルギー比が 10% 以下となるような厳しい糖質制限食を用いている。このことから、動物実験で観察された糖質制限による体脂肪量の蓄積抑制効果は、ヒトにおいてはより厳しい糖質制限によってのみ得られる可能性が考えられる。

2. 糖質制限食が糖代謝能に及ぼす影響

動物実験において、糖質制限食による糖代謝能への影響は、軽度な糖質制限および無糖質条件下において検討されている (Okitolonda W, 1988、Blouet C, 2006 および Sanchez RM, 2006)。

軽度な糖質制限が糖代謝能に及ぼす影響を検討した先行研究において、Okitolonda W (1988) は、ラットに高タンパク・低糖質食 (タンパク質エネルギー比 55%、脂質エネルギー比 14% および糖質エネルギー比 31%) を 9 週間与えた場合、経口糖負荷試験 (OGTT, 2g/kg glucose of body weight) 時の血漿グルコースおよびインスリン濃度において、普通食群との間に有意な差がみられなかったことを報告している。また、空腹時

の血漿グルコース濃度は両群の間に差はみられなかったが、インスリン濃度は高タンパク・低糖質食群において有意に低い値を示した。この結果から、ラットにおける長期間の軽度な糖質制限は、糖代謝能に悪影響を及ぼさず、むしろ好ましい影響をもたらすのかもしれない。

また、同程度の軽度な糖質制限における糖代謝能を検討した先行研究において、Blouet C (2006) は、高タンパク・低糖質食（タンパク質エネルギー比 53%、脂質エネルギー比 9%および糖質エネルギー比 38%）を 8 週間与えたラットを用いて OGTT (1g/kg glucose of body weight) を実施した。その結果、普通食群と比較して、高タンパク・低糖質食群において摂餌量、体重および腹腔内脂肪量が有意に低い値を示したことに伴い、OGTT 時の血漿グルコース濃度の上昇が抑制され、さらにインスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) も有意に低い値となったことを報告している。加えて、摂餌量の差による影響を除外するために、高タンパク・低糖質食群の摂餌量を制限し、普通食群との摂餌量を同等として検討を行った場合において、体重および体脂肪量は普通食群と比較して有意に低い値を示したが、OGTT 時の血糖曲線および HOMA-IR には、両群の間に有意な差がみられなかった。これらの結果から、高タンパク・低糖質食は自由摂食条件において、摂餌量が減少することにより糖代謝能に好影響を与える一方で、摂餌量が同じ場合は糖代謝能に影響を及ぼさないことが考えられる。しかしながら、この報告では OGTT 時の血漿インスリン濃度を測定していないため、糖質制限がインスリン抵抗性に及ぼす影響については、必ずしも明らかとなっていない。

これらの先行研究から、低糖質食のような軽度な糖質制限では、普通食と比較して糖代謝能を減退させる作用が認められていない一方で、Sanchez RM (2006) は、より厳しい糖質制限を行った高タンパク・無糖質食（タンパク質エネルギー比 65%、脂質エネルギー比 35%および糖質エネルギー比 0%）を用いてラットの耐糖能への影響を検討している。その結果、摂食開始 3 週間後における OGTT (OGTT, 2g/kg glucose of body weight) 時の血漿グルコース曲線下面積は、普通食群と比較して高タンパク質・無糖質食群にお

いて有意に高い値を示したことから、高タンパク・無糖質食は耐糖能を低下させることが考えられる。しかしこの実験では、両群の間において体重に有意な差はみられなかったものの、普通食群における食餌中の脂質エネルギー比が 12%と低い一方で、高タンパク質・無糖質食群では 35%と約 3 倍も脂質量が多い食餌を摂取していた。先行研究において、高脂肪食が摂取エネルギー量の増加につながり、腹腔内脂肪量の蓄積を招くことで、糖代謝能を低下させることが報告されている (Fraulob JC, 2010) ことから、Sanchez RM (2006) の実験で得られた結果は、糖質制限による糖代謝能への影響を正確に反映していない可能性が考えられる。

また、ヒトを対象として、厳しい糖質制限食 (糖質エネルギー比 10%未満) が糖代謝能に及ぼす影響を検討した研究もいくつか存在する。肥満者を対象とした先行研究において、Kerksick CM (2010) は、14 週間の高タンパク・糖質制限食 (タンパク質エネルギー比 63%、脂質エネルギー比 30%および糖質エネルギー比 7%) によって、減量後の空腹時血漿インスリン濃度が普通食群と比較して低い値を示したことに伴い、HOMA-IR が有意に低下したことを報告している。また、Brinkworth GD (2009) は、高脂肪・糖質制限食 (タンパク質エネルギー比 35%、脂質エネルギー比 61%および糖質エネルギー比 4%) を 52 週間に渡って摂取した肥満者において、普通食群と比較して有意に HOMA-IR が低下したことを示している。これらの先行研究において、肝臓のインスリン抵抗性を示す指標である HOMA-IR が有意に低い値を示したことは、ヒトにおいて長期的な糖質制限が肝臓の糖代謝能に悪影響を及ぼさず、むしろ好ましい影響を与えることを示唆している。しかしながら、Fontana L (2010) は、長期間 (3~20 年) のカロリー制限を行っているヒトにおいて、コントロール群と比較して HOMA-IR が有意に低い値を示す一方で、OGTT (75g glucose) 時の血漿グルコース濃度が有意に高い値を示したことを報告している。この結果から、HOMA-IR と全身の耐糖能が必ずしも一致しないことが示唆されていることから、糖質制限が糖代謝能に及ぼす影響は、HOMA-IR だけではなく、OGTT などを用いて全身の糖代謝への影響を検討する必要がある。

あると考えられる。

II. 糖代謝能に関わる糖代謝関連分子

1. 骨格筋および脂肪組織の糖輸送体 GLUT4 が糖代謝能に及ぼす影響

血糖値は、腸管において吸収されるグルコース量と、肝臓から放出されるグルコース量、さらに体内の臓器において取り込まれるグルコース量の収支によって決まる。安静時には脳組織や骨格筋、脂肪組織で処理されるが、血糖値が高い状態、つまり食後のような場合は、インスリンの標的器官である骨格筋と脂肪組織の役割が重要である。実際、これまでの研究により、食事などで摂取された糖質の 85%以上は骨格筋において処理されることが報告されている (DeFronzo RA, 1981)。このことから、糖代謝不全の原因として、骨格筋の糖代謝能の異常が注目されている。骨格筋における糖代謝の律速段階として、①血液からグルコースを取り込む段階、もしくは②取り込んだ糖がヘキソキナーゼ (HK) によってリン酸化され、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) になる段階の 2 つが想定されている。ラット骨格筋における HK は筋湿重量 100g あたり約 500 μ mol/min の割合で糖を G-6-P に変換している。一方、糖取り込み速度は、トレーニングを積んだ筋においても、約 15 μ mol/min と、HK における酵素活性 (グルコースを G-6-P に変換する能力) と比べて非常に低い。従って、骨格筋における糖代謝は筋細胞内への糖取り込み段階によって律速されていることが考えられる。そこで、骨格筋における糖代謝能のなかでも、特に糖取り込み能を増強させることが、糖代謝能を維持・充進させる上で重要になると考えられる。

グルコースは糖輸送体と呼ばれるタンパク質キャリアーを介して促進拡散的に細胞内に取り込まれることが知られており、骨格筋には、GLUT-1 および GLUT-4 という 2 種類の糖輸送体が発現している。GLUT-1 は常時、細胞膜上に存在しているが、その発現量は非常に少なく、主に安静時状態における糖取り込み速度を担っていると考えられている (Douden AG, 1990 および Mueckler M, 1994)。一方、GLUT-4 は、骨格筋におけ

る主要な糖輸送体であり、主な特徴として、細胞中の GLUT-4 小胞から細胞膜へトランスロケーション（細胞内移動）（Fig 2-1）することによって糖取り込みを調節することが挙げられ、Douen AG（1990）は、骨格筋において筋収縮やインスリン刺激によって細胞膜表面の GLUT-4 が増加することに伴い、グルコース取り込み量が亢進することを報告している。

また、骨格筋の糖取り込み量は、骨格筋の GLUT-4 発現量によって規定されていることが知られている。Henriksen EJ（1990）は、ラットを用いて、GLUT-4 タンパク含量が異なる滑車筋、ヒラメ筋、長指伸筋および長指屈筋それぞれにインスリンおよび収縮刺激を与えた際の糖取り込み能を検討している。その結果、それぞれの刺激および両刺激を組み合わせた検討全てにおいて、GLUT-4 タンパク含量と糖取り込み量との間に強い正の相関関係が認められたことを報告している。

骨格筋の糖代謝能における GLUT-4 の重要性は、遺伝子工学的手法を用いた研究においても示されており、Hansen PA（1995）は、骨格筋の GLUT-4 を過剰発現させたマウスにおいて、骨格筋の糖取り込み能が有意に高い値となったことを報告している。また、Kim JK（2001）は、骨格筋の GLUT-4 ノックアウトマウスにおいて、インスリン刺激時における骨格筋の糖取り込み量が顕著に低い値となることを報告している。

一方、脂肪組織の GLUT-4 を過剰発現もしくはノックアウトしたマウスにおいても、同様の結果が報告されており、Abel ED（2001）は、脂肪組織特異的に GLUT-4 をノックアウトしたマウスにおいて、耐糖能が顕著に悪化することを報告している。また、Carvalho E（2005）は、骨格筋の GLUT-4 をノックアウトしたマウスにおいて、脂肪組織の GLUT-4 を過剰発現させた場合、骨格筋の GLUT-4 をノックアウトしたマウスだけでなく、野生型のマウスと比較しても有意に高い耐糖能を示したことを報告している。また、ヒト糖尿病患者において、骨格筋の GLUT-4 は健常者と比較して有意な差が認められていない（Pedersen O, 1990 および Eriksson J, 1992）のに対し、脂肪組織の GLUT-4 は減少する（Maianu L, 2001 および Kouidhi S, 2011）ことが報告されている

ことから、骨格筋と同様に、脂肪組織における糖代謝能も全身の糖代謝能に重要な役割を担っていることが考えられる。

また、これまで行われた数多くの研究において、身体運動トレーニングは、そのトレーニングで用いられた骨格筋において特異的に GLUT-4 を増加させ、それに伴いその筋における糖取り込み速度も増加させることが報告されている (Rodnick KJ, 1992、Brozinick JT, 1993 および Ren JM, 1994)。また、Hirshman MF (1993) は、身体運動トレーニングによって脂肪組織においても同様に GLUT-4 含量が増加することと、それに伴い脂肪細胞における糖取り込み速度が増加することを報告している。

このように、GLUT-4 の発現量は運動によって増加することがよく知られている一方で、インスリンによる影響を受けることも報告されている。Kawanaka K (1996) は、膵臓のランゲルハンス島を選択的に破壊する薬剤である、STZ を投与 (80~100 mg/kg body weight) することにより、膵臓のインスリン分泌能が顕著に低下したラットにおいて、ヒラメ筋の GLUT-4 含量が有意に低下することを報告している。また、Begum N (1992) は、STZ を投与 (65 mg/kg body weight) したラットの脂肪細胞において、GLUT-4 含量が有意に低下することと、インスリン刺激による糖取り込み能が有意に低い値を示すことを報告している。これと関連して、Mora S (2000) は、STZ を投与 (90~100 mg/kg body weight) したラットの心臓および骨格筋において、GLUT-4 プロモーターに結合し、GLUT-4 発現を促進する転写因子である Myocyte Enhancer Factor (MEF) -2A 含量が低下することを報告している。これらの報告から、インスリン刺激の低下は、糖代謝に重要な役割を果たす骨格筋および脂肪組織の GLUT-4 に対して、遺伝子レベルから影響を及ぼし、その発現量を低下させることで、糖代謝能を悪化させると考えられている。また、このような先行研究の結果から、厳しい糖質制限は、STZ の投与ほどは強力でないものの、インスリン分泌を減弱させることで、GLUT-4 の発現量を低下させ糖代謝能を悪化させる可能性が考えられる。

2. 腸管における糖輸送体 GLUT-2 が糖代謝能に及ぼす影響

全身の糖代謝能は、骨格筋や脂肪組織などにおける糖取り込みや、肝臓における糖放出の他に、腸管における糖吸収によっても影響を受ける。これまでの先行研究において、腸管における糖吸収は、能動輸送を行う糖輸送体 SGLT-1 と、受動輸送を行う糖輸送体 GLUT-2 により制御されていることが示唆されている (Kellett GL, 2008)。Kellett GL (2000) は、ラットの腸管を用い、0~100 mM 濃度のグルコース溶液を灌流した実験において、SGLT-1 による糖吸収量が 30~50 mM のグルコース濃度において飽和することと、グルコース濃度が増加するにつれて、頂端膜上 (腸管内腔側) における GLUT-2 タンパク含量が増加し、GLUT-2 による糖吸収量への貢献度が大きくなることを報告している。さらに、この実験において、100 mM のグルコース濃度における GLUT-2 による糖吸収量が 75%程度であったことから、食後など、腸管内のグルコース濃度が高くなる状況において、最大糖吸収量は GLUT-2 により制御されていることが示唆されている。

また、この頂端膜上における GLUT-2 量の増加は、糖質摂取直後に生じることが認められており、Gouyouin F (2003) は、40%グルコース溶液 0.4 ml を絶食時のマウスに経口投与した場合、30 分後に空腸の刷子縁膜 (実験上、頂端膜を小胞状にしたもの) における GLUT-2 含量が、PBS を投与した群と比較して有意に高い値となることを報告している。したがって、腸細胞に発現している GLUT-2 は、頂端膜上へトランスロケーションすることで、糖吸収を調節していると考えられている (Fig 2-2)。さらに Gouyouin F (2003) の先行研究では、食餌条件による頂端膜上の GLUT-2 タンパク含量の変化についても検討しており、高フルクトース食を 5 日間摂取したマウスにおいて、空腸の刷子縁膜における GLUT-2 含量が、普通食群と比較して有意に高い値を示すことを示している。同様に、Tobin V (2008) は、高脂肪食を 30 日間摂取したインスリン抵抗性を持つマウスにおいて、絶食時における刷子縁膜の GLUT-2 が増加することを報告している。これらの先行研究の結果から、高フルクトースおよび高脂肪食は GLUT-2 の頂端膜上へのトランスロケーションを増加させ、糖吸収を促進することでも血糖値の上昇に寄与し

ている可能性が示唆されている。

また、腸管全体に発現している糖輸送体量について、Gouyouin F (2003) は、高タンパク・無糖質食（タンパク質エネルギー比 86%および脂質エネルギー比 14%）を摂取したマウスの空腸における GLUT-2 および SGLT-1mRNA 量が、高フルクトース食と高グルコース食を摂取したマウスと比較して、有意に低い値を示したことを報告している。この結果から、糖質制限によって腸管の糖輸送体量が低下することが推測されるが、この実験では mRNA の発現量のみが測定されており、タンパク含量の測定を行っていない。腸管における糖輸送体含量は糖吸収能に影響を及ぼすことが推測されるため、今後、糖質制限が腸管全体の糖輸送体タンパク含量に及ぼす影響を検討する必要があると考えられる。

III. 糖代謝能に影響を及ぼす要因

1. 内臓脂肪量が糖代謝能に及ぼす影響

肥満が糖代謝能を低下させることがよく知られている一方で、同じ肥満症であっても、体脂肪分布の違いによって糖代謝能に差が生じることがよく知られている。Yamashita S (1996) は、コンピュータ断層撮影法を用いて、内臓脂肪が多い肥満者と皮下脂肪が多い肥満者における糖代謝能の違いを検討しており、皮下脂肪が多い肥満者と比較して、内臓脂肪が多い肥満者は経口糖負荷試験における耐糖能が有意に低い値を示したことから、内臓脂肪量/皮下脂肪量比と血漿グルコース曲線下面積との間に、正の相関関係が認められたことを報告している。さらに、安静時の血漿グルコース濃度においても内臓脂肪が多い肥満者において高い値が認められたことから、内臓脂肪の蓄積は糖代謝能を悪化させることが考えられる。

この内臓脂肪量の蓄積によって糖代謝能を悪化させるメカニズムとして、近年、内臓脂肪組織から分泌されるホルモン、アディポカインによる影響が示唆されている (Matsuzawa Y, 2008)。アディポカインの代表的なものとしては、インスリン抵抗性を

改善する作用を持つアディポネクチンが挙げられ、このアディポネクチンは内臓脂肪量と負の相関関係があることが報告されている (Cnop M, 2003)。また、アディポネクチンを投与することによって、骨格筋および肝臓インスリン抵抗性が改善されることが報告されており (Berg AH, 2001 および Yamauchi T, 2001)、遺伝子工学的手法を用いた検討においても、肥満モデルマウスに対してアディポネクチンを過剰発現させたマウスにおいて、肥満モデルマウスと比較して高い耐糖能が認められたこと (Yamauchi T, 2003) や、アディポネクチンをノックアウトしたマウスにおいてインスリン抵抗性が悪化すること (Maeda N, 2002) などが示されているからも、アディポネクチンが糖代謝能に好ましい影響を及ぼすことが考えられる。このアディポネクチンはヒトにおいてもその影響が検討されており、Kern PA (2003) は、血漿アディポネクチン濃度とインスリン感受性指数との間に強い相関関係が認められることを報告している。

一方、インスリン抵抗性を増悪させるアディポカインとしては、Tumor Necrosis Factor (TNF) - α が代表的なものとして挙げられる。Plomgaard P (2007) は、コントロール群と体脂肪量に差のない 2 型糖尿病患者において、性別や体力などの要因を除外しても、インスリン感受性と血漿 TNF- α 濃度の間に負の相関関係が認められることを報告している。また、TNF- α に暴露させた筋培養細胞において、インスリンシグナル伝達に働く Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) 活性が低い値を示すこと (Maeda N, 2002) から、TNF- α が糖代謝能を低下させる作用を持つことが支持される。この血漿 TNF- α 濃度は、ウエスト周囲径との間に正の相関関係があることが報告されていること (Park HS, 2005) から、内臓脂肪量の増加によってその分泌能が増加すると考えられている。

アディポカインには、後述する血漿遊離脂肪酸も含まれており、インスリンシグナル伝達を阻害することによって、骨格筋の糖代謝能に悪影響を及ぼすことが示唆されている。他にも、レジスチン (Steppan CM, 2002) や MCP-1 (Kanda H, 2006) などのアディポカインが糖代謝能に悪影響を及ぼす可能性が示唆されており、近年、内臓脂肪の

蓄積による糖代謝能への悪影響と血中アディポカイン動態との関係についての研究が精力的に進められている。

2. 骨格筋トリグリセライド含量が糖代謝能に及ぼす影響

骨格筋トリグリセライド (IMCL) の存在は、1967 年に Denton および Randle により初めて報告された (Denton RM および Randle PJ, 1967)。また近年、肥満者および 2 型糖尿病患者において IMCL 含量とインスリン抵抗性の間に正の相関関係が認められること (Goodpaster BH, 2000) や、高脂肪食により IMCL 含量が増加すると平行して、インスリン感受性が低下すること (Bachmann OP, 2001)、さらに食事制限による減量が IMCL の減少に伴いインスリン感受性を改善させること (Toledo FG, 2008) などが報告されており、IMCL の蓄積は糖代謝能を低下させる要因の一つであると考えられている。

近年、IMCL に加え、骨格筋のインスリン抵抗性は、セラミドおよびジアシルグリセリド (DAG) などの脂質合成過程における中間代謝産物により引き起こされる可能性も示唆されている。セラミドはスフィンゴ脂質ファミリーの 1 つであり、細胞膜の構成要素として重要な脂質である。セラミドは骨格筋において、Akt/プロテインキナーゼ B (Akt/PKB)、プロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) およびプロテインキナーゼ C (PKC) などのインスリン刺激を伝達する酵素の働きを低下させることにより、GLUT-4 のトランスロケーションを阻害し、糖代謝能を低下させることが示唆されている (Chavez JA, 2003 および Stratford S, 2004)。また、ヒトにおいて、肥満者は健常者と比較して骨格筋セラミド含量が多いこと (Adams JM, 2004) や、骨格筋のインスリン抵抗性が高い肥満者は、インスリン抵抗性を持たない肥満者と比較して骨格筋セラミド含量が有意に高いこと (Coen PM, 2010) も報告されている。

一方、DAG は筋細胞膜において情報を伝達する役割を担っており、脂肪滴の分解およびトリグリセライド合成における中間代謝産物である。この DAG の蓄積は、PKC ϵ

および θ を活性化し、インスリン受容体基質 1 (IRS-1) のセリン残基をリン酸化することでインスリン伝達機序を阻害することが報告されている (Timmers S, 2008)。その結果、インスリン刺激による GLUT-4 のトランスロケーションが阻害され、インスリン抵抗性が生じることにつながる。肥満者や 2 型糖尿病患者において、骨格筋 DAG 含量が多いこと (Bergman BC, 2012) や、減量および運動により骨格筋 DAG 含量の減少に伴ってインスリン感受性が改善されること (Dubé JJ, 2011) といった報告からも、インスリン抵抗性の発症における DAG の重要性が示唆されている。

3. 肝臓トリグリセライド含量が糖代謝能に及ぼす影響

肝臓で合成されたグルコースが血液へ放出される量は、インスリンが作用することによって抑制されるため、肝臓におけるインスリン抵抗性の増加は、インスリン抵抗性が無い状態と比較して血中へのグルコース放出量が高い値となる (Nagle CA, 2009)。Marchesini G (1999) は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NASH) 罹患者における耐糖能および HOMA-IR が、コントロール群と比較して有意に高い値を示すことを報告しており、肝臓中の脂肪蓄積が肝臓のインスリン抵抗性の発症原因となる可能性を示唆している。また、Samuel VT (2004) は、高脂肪食を 3 日間給餌したラットにおいて、肝臓のトリグリセライドおよび DAG 含量の増加に伴い、PKC ϵ 活性の亢進と IRS-1 のセリン残基のリン酸化が生じ、Hyperinsulinemic euglycemic clamp 試験中における内因性のグルコース放出量が普通食群と比較して高い値となることを報告している。以上の結果から、肝臓中のトリグリセライドおよび DAG の蓄積は、インスリンシグナル伝達を悪化させ、肝臓のインスリン抵抗性を発症させる要因となっていることが考えられる。

4. 血中遊離脂肪酸濃度が糖代謝能に及ぼす影響

糖代謝能と血漿遊離脂肪酸 (Free Fatty Acid, FFA) 濃度の関係について、Boden G (1994) は、Euglycemic hyperinsulinemic clamp 法を用いた研究において、血漿 FFA

濃度を上昇させることで、急性（2 時間後）的に骨格筋のインスリン抵抗性が生じ、糖取り込み能が低下することを報告している。さらに、同様の実験条件において、インスリンシグナル伝達系の酵素である、PI3-K の活性が血漿 FFA 濃度の増加により骨格筋において有意に低下することが示されている（Dresner A, 1999）ことから、血漿 FFA 濃度の上昇は、インスリンシグナル伝達系を減弱させることで、インスリン抵抗性を生じさせる可能性が示唆されている。

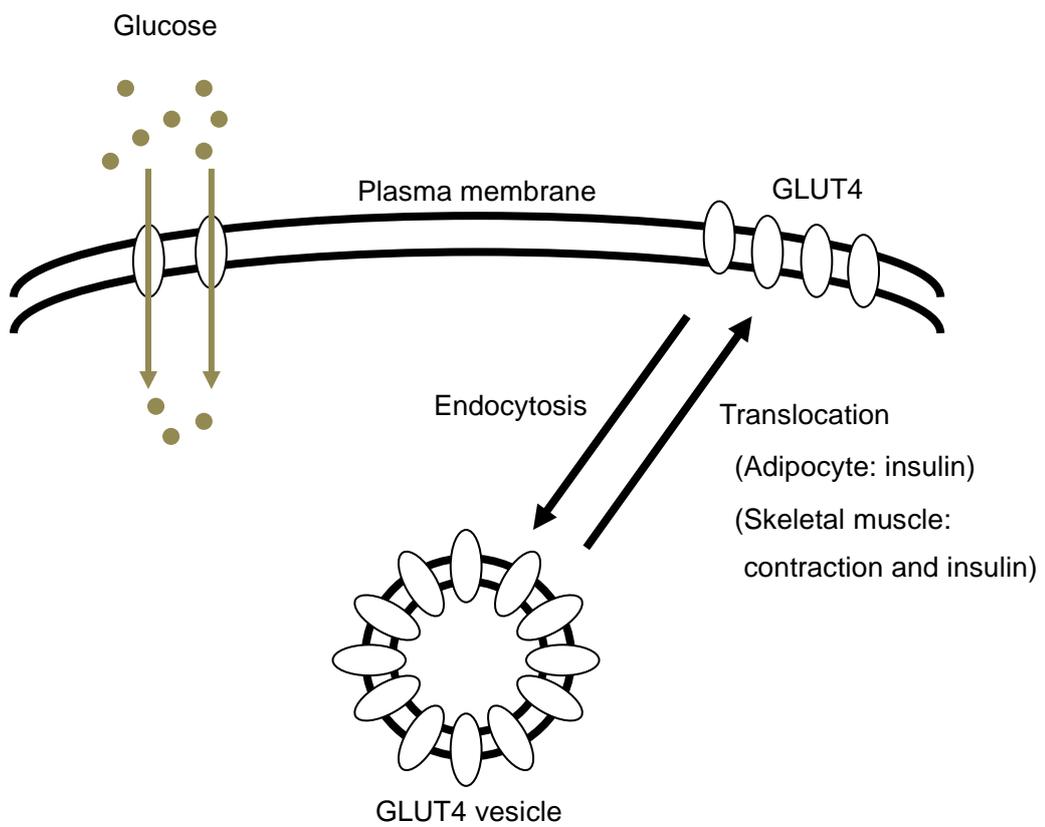


Fig 2-1. Regulated translocation of GLUT4 in skeletal muscle and adipocyte membrane

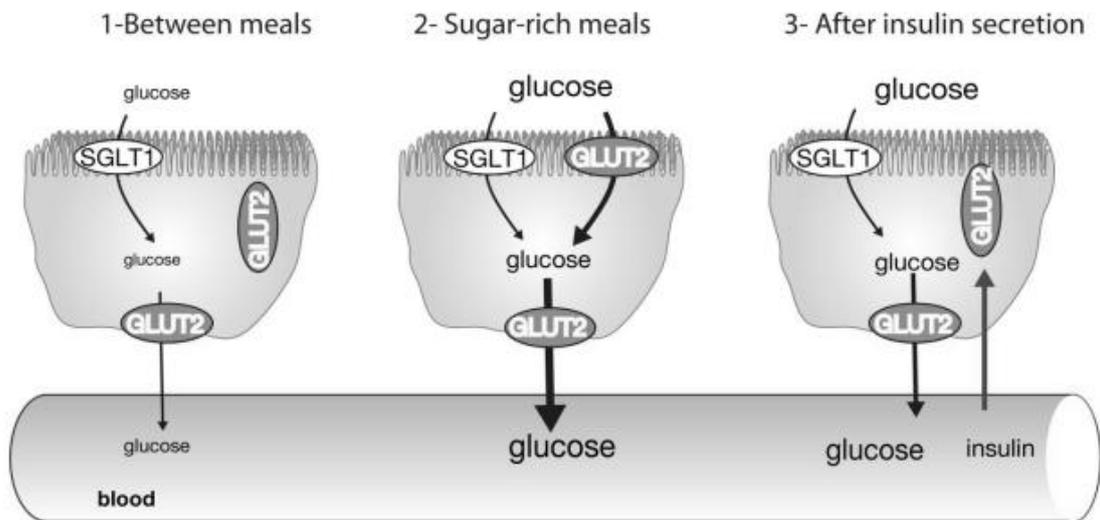


Fig 2-2. Regulated translocation of GLUT2 in foodfacing enterocyte membrane (Leturque A, 2009) .

第3章 研究課題

研究課題1 無糖質食がラットの糖代謝能に及ぼす影響 -自由摂食条件による検討-

I. 目的

厳しい糖質制限を行うことで、体脂肪量の減少が期待できるものの、その一方で、長期間にわたってインスリン分泌が少ない状況が続くことにより、全身の糖代謝能に悪影響が生じる可能性が考えられる。そこで本研究では、長期間の無糖質食摂取がラットの腹腔内脂肪量および耐糖能に及ぼす影響について検討することを目的とした。まず研究課題1では、自由摂取条件で飼育を行い、無糖質食がラットの摂食行動に及ぼす影響も併せて検討することとした。さらに本課題では、GLUT-4、GLUT-2といった糖代謝と関連する分子の発現量や、骨格筋トリグリセライド含量および血漿遊離脂肪酸濃度などの糖代謝能と関連する要因を分析することで、その効果のメカニズムを明らかとすることを目的とした。

II. 方法

1. 実験動物および飼育条件

本課題では、5週齢、Sprague-Dawley (SD) 系雄ラット (体重 210~240g) (日本クレア株式会社) 14匹を用いて実験を行った。ラットは、室温 23°C、午後 9 時~午前 9 時を暗期に設定した飼育室において、個別に飼育が可能なステンレス製ケージを使用し、1匹ずつ飼育した。予備飼育期間には、飼料として、げっ歯類の基礎飼料である AIN-93G (Reeves PG, 1993) を一部改編し、デキストリン化コーンスターチをコーンスターチに置換した粉末飼料と、飲料として水道水を自由摂取させた。粉末試料は、コーンスターチ (オリエンタル酵母工業株式会社)、ミルクカゼイン (オリエンタル酵母工業株式会社)、スクロース (三井製糖株式会社)、キャノーラ油 (日清オイリオグループ株式会社)、

セルロース（オリエンタル酵母工業株式会社）、AIN-93G ミネラル混合（オリエンタル酵母工業株式会社）、AIN-93 ビタミン混合（オリエンタル酵母工業株式会社）、L-シスチン（和光純薬工業株式会社）、コリン酒石酸水素塩（和光純薬工業株式会社）および T-ブチルヒドロキノン（和光純薬工業株式会社）を混合して作成した（Table 3-1）。

1 週間の予備飼育終了後、ラットをコントロール群（Con 群：n=7）と高タンパク・無糖質食群（HPCF 群：n=7）に、体重および予備飼育期間の体重増加量と飼料効率（体重増加量÷摂餌量×100：値が大きいほど飼料の体重増加作用が大きい飼料を意味する）の平均値および標準誤差が均等となるように分けた。Con 群には、予備飼育期間と同じ飼料（タンパク質エネルギー比率 19.2%、脂質エネルギー比率 21.6%、炭水化物エネルギー比率 59.2%）を与えた（Table 3-1）。一方、HPCF 群には、糖質（スクロースおよびコーンスターチ）を、タンパク質（ミルクカゼイン）で置換した、食餌重量あたりの総エネルギー量が同じ飼料（タンパク質エネルギー比率 76.7%、脂質エネルギー比率 21.6%、糖質エネルギー比率 1.7%）を給餌した（Table 3-1）。HPCF 群の糖質エネルギー比が 0%とならないのは、AIN-93G ミネラル混合および AIN-93 ビタミン混合にすでにスクロースが添加されているためである。本研究では、1) 食餌中の脂質量を増やすことで、摂取エネルギー量の増加に伴う腹腔内脂肪の過剰蓄積という糖質制限とは異なる要因によって糖代謝能が悪化することが考えられる、2) ラットを用いた先行研究では、タンパク質および脂質のエネルギー比率がそれぞれ 90、10%の飼料でも、長期飼育が可能であり、体脂肪の減少効果が認められている（Marsset-Baglieri A, 2004）、という理由から、糖質の代わりに脂質ではなくタンパク質の配合量を増やし、高タンパク質・無糖質食を試験食として用いた。飲料は水道水を用い、飲料、食餌ともに自由摂取とし、6 週間飼育した。なお、本実験は早稲田大学スポーツ科学部実験委員会の承認を得て行われた。

2. 経口糖負荷試験 (OGTT)

飼育期間開始より 6 週間後に経口糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) を行った。前日より 13 時間絶食させたラットの尾静脈から投与前 (空腹時) の採血を行った後、体重 1 kg あたり 2g のグルコース (40%濃度グルコース溶液を体重 1g あたり 5 μ l) を経口投与し、投与から 30、60、90 および 120 分後にヘパリン処理されたヘマトクリットチューブ (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社) を用いて尾静脈より採血した。血液は静置した後、遠心分離 (10000 rpm、室温、10 分間) により分離し、血漿を分析まで -80°C のフリーザーで保存した。

3. 組織の摘出および保存

OGTT の実施から 3 日後の午後 1 時から、体重 100g あたり 5 mg のペントバルビタールナトリウム投与による完全麻酔下において組織試料の摘出を行った。なお、解剖の前日は絶食させることなく、通常の飼育条件で飼育を行った。解剖では、心臓から採血を行った後、肝臓、腹腔内脂肪 (副睾丸脂肪、後腹膜脂肪および腸間膜脂肪)、腎臓、空腸 (胃の噴門部から盲腸までの腸管を切除し、その腸管を 3 等分した中間部分)、骨格筋 (ヒラメ筋および足底筋) を摘出した。採取した肝臓、腹腔内脂肪、腎臓およびヒラメ筋については、電子天秤で重量を測定した。また、骨格筋サンプル、腹腔内脂肪および空腸は、摘出直後に液体窒素に浸漬することで凍結し、分析まで -80°C のフリーザーで保存した。

4. 分析方法

(1) 血液生化学的項目

i) 血漿グルコース濃度の測定

血漿グルコース濃度は、グルコース CII テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。6.6 μ l の血漿を 1 ml の発色試液 (ムタロターゼ、グルコースオキシダ

ーゼ、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびアスコルビン酸オキシダーゼを緩衝液（リン酸緩衝液 pH7.1 およびフェノール）に溶解したものと混合し、5 分間、37°Cの恒温槽（Personal-10 INCUBATOR, タイテック株式会社）で加温した後、505nm における吸光度を分光光度計（NanoDrop 2000c, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社）で測定した。ブドウ糖標準液から算出した検量線から、血漿グルコース濃度（mg/dL）を求めた。

ii) 血漿インスリン濃度の測定

血漿インスリン濃度は、Rat Insulin ELISA Kit（Mercodia 社）を用いて測定した。10 μ l の血漿を Mouse monoclonal anti-insulin 抗体が結合した Coated plate の各ウェルに加え、さらに 100 μ l の Enzyme conjugate 1 \times solution（Peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-insulin）を加えた後、260 rpm、2 時間、室温で攪拌（SHAKER SR-1, アズワン株式会社）した。次に、各ウェルを 300 μ l の Wash buffer 1 \times solution で 6 回洗浄し、200 μ l の Substrate TMB（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine）を加えて 15 分、室温で静置した。50 μ l の Stop solution（0.5 M H₂SO₄）を各ウェルに加えて発色反応を止めた後に、450 nm における吸光度を分光光度計（DTX880 MULTIMODE DETECTOR, ベックマン・コールター株式会社）で測定した。Calibrator 標準液（Rat insulin）から算出した検量線から、血漿インスリン濃度（pmol/L）を求めた。

iii) 血漿遊離脂肪酸濃度の測定

血漿遊離脂肪酸濃度は、NEFA C-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。5 μ l の血漿と 100 μ l の発色試液 A（コエンザイム A、アデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム、アシル CoA シンセターゼ、4-アミノアンチピリンおよびアスコルビン酸オキシダーゼをリン酸緩衝液 pH7.0 で溶解した溶液）を混合し、10 分間、37°Cで加温した。次に、200 μ l の発色試液 B（アシル-CoA-オキシダーゼおよびペルオキシダー

ゼを 3-メチル-N-エチル-N-アニリンで溶解した溶液) を加え、10 分間、37°C で加温した後、550 nm における吸光度を分光光度計 (NanoDrop 2000c, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社) で測定した。基準液 (オレイン酸) から算出した検量線から、血漿遊離脂肪酸濃度 (mEq/L) を求めた。

iv) 血漿トリグリセライド濃度の測定

血漿トリグリセライド濃度は、トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。まず、5 μ l の血漿と 750 μ l の発色試液 (リポプロテインリパーゼ、アデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム三水和物、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、3, 5-ジメトキシ-N-エチル-N-アニリンナトリウム、4-アミノアンチピリンおよびアスコルビン酸オキシダーゼを緩衝液 (グッド緩衝液 pH6.5) で溶解した溶液) を混合した。その後、5 分間、37°C で加温し、600 nm における吸光度を分光光度計 (DTX880 MULTIMODE DETECTOR, ベックマン・コールター株式会社) で測定した。基準液 (グリセリンおよびトリオレイン) から算出した検量線から、血漿トリグリセライド濃度 (mg/dL) を求めた。

v) インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) の算出

インスリン抵抗性の指標の 1 つである Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) を空腹時インスリン値および血糖値から算出した。HOMA-IR は、インスリン抵抗性の正確な測定方法である Euglycemic hyperinsulinemic clamp 法との間に強い相関が認められており、インスリン抵抗性の指標として用いられている (DR Matthew, 1985)。DR Matthews ら (1985) は、この HOMA-IR をインスリン抵抗性の指数として、ヒトにおいて正常値が 1 となるように計算式を作成しており (空腹時インスリン値 (μ U/ml) \times 空腹時血糖値 (mg/dl) /405)、本研究では、ラットにおいても同様に適用できるという仮定のもと、この計算式により算出された HOMA-IR を

インスリン抵抗性の指標として用いることとした。

vi) グルコース曲線下面積およびインスリン曲線下面積の算出

OGTT 中の 120 分間全体における耐糖能を評価するために、グルコースおよびインスリン曲線下面積を算出した。また、経口投与したグルコースによる影響のみを評価するために、下記の式を用い、空腹時の値を差し引いて求めた。

$$\begin{aligned} \text{曲線下面積} &= ((\text{OGTT30 分値} - \text{空腹時値}) \times 30/2) \\ &+ ((\text{OGTT30 分値} - \text{空腹時値}) + (\text{OGTT60 分値} - \text{空腹時値}) \times 30/2) \\ &+ ((\text{OGTT60 分値} - \text{空腹時値}) + (\text{OGTT90 分値} - \text{空腹時値}) \times 30/2) \\ &+ ((\text{OGTT90 分値} - \text{空腹時値}) + (\text{OGTT120 分値} - \text{空腹時値}) \times 30/2) \end{aligned}$$

(2) 骨格筋および副睪丸脂肪における GLUT-4 および空腸の GLUT-2 含量の測定

i) ホモジナイズおよびホモジネートの調整

本課題では、ヒラメ筋を GLUT-4 タンパク含量の測定用に用いた。また、腹腔内脂肪における GLUT-4 タンパク含量の同定には、副睪丸脂肪を用いた。測定部位の違いによる影響を除外するために、摘出した空腸は乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で均一になるまで粉砕し、GLUT-2 タンパク含量の測定用サンプルとして使用した。

まず、氷冷したガラス製ホモジナイザーにサンプルを入れ、Protease inhibitor (SIGMA-Aldrich 社) を添加したホモジナイズバッファー (RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 1mM EDTA) , Upstate 社) を加えてホモジナイズを実施した。ホモジナイズしたサンプルは、凍結・融解を 2 度繰り返し、700xg で 5 分間遠心した後に上清を採取した。

ii) 電気泳動用サンプルの調整

調整した上清サンプルを BCA protein assay reagent 溶液 (BCA Protein Assay Kit, Pierce 社) と混合し、30 分間、37°C で加温した後に、562 nm における吸光度を分光光度計 (DTX880 MULTIMODE DETECTOR, ベックマン・コールター株式会社) を用いて測定した。次に、算出されたタンパク濃度をもとに、タンパク濃度が $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ヒラメ筋および副辜丸脂肪) および $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (空腸) となるようホモジナイズバッファーと Sample buffer (和光純薬工業株式会社) とを混合した。ヒラメ筋および副辜丸脂肪の GLUT-4 測定用サンプルには、2-mercaptoethanol を含まない Sample buffer と混合したサンプルを用意した。空腸の GLUT-2 測定用サンプルには 2-mercaptoethanol を含む Sample buffer と混合したのち、95°C で 5 分間加温したものを電気泳動サンプルとした。

iii) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質の分離は、Laemmli の方法 (1970) に基づき、ポリアクリルアミド 10% (GLUT-4) もしくは 7.5% (GLUT-2) の Resolving gel および 4% Stacking gel を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離した。1 レーンあたり $5 \mu\text{g}$ (GLUT-4) および $50 \mu\text{g}$ (GLUT-2) のタンパク質サンプルをアプライし、サンプルがゲルの下端に達するまで 100 V~120 V で通電した。

iv) ウェスタンブロッティング

電気泳動終了後、速やかにゲルを取り出し、ウェット式ブロッティング装置 (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad 社) を用いて、200 mA で 90 分間通電し、Poly Vinylidene DiFluoride (PVDF) メンブレン (Millipore 社) にタンパク質を転写した。転写したメンブレンに、10% (w/w) スキムミルク/Phosphate Buffered Saline, 0.1% Tween 20 (PBS-T) を用いたブロッキング処理を行った後、一次抗体反応 (ヒラメ筋および副辜

丸脂肪 : GLUT-4 【Generous gift from Dr. Mike Mueckler (Washington University, St. Louis, MO)】 , 10000 倍希釈および空腸 : GLUT-2 【Calbiochem 社】 , 1000 倍希釈) を 4°C で一晩行った。翌日、メンブレンを PBS-T で洗浄し、二次抗体 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch 社, 10000 倍 (GLUT-4) および 5000 倍 (GLUT-2) 希釈) 反応を室温で 1 時間行った。PBS-T および PBS で十分に洗浄した後、化学発光検出試薬 (ECL reagent, GE Healthcare Life Sciences 社) で 1 分間反応させた。反応終了後、LAS-3000 (FUJIFILM 株式会社) を用いて、抗原の検出を行った。検出されたバンドは Multi Gauge (FUJIFILM 株式会社) を用いて定量し、その値をコントロール群の平均値に対する相対値で示した。

(3) 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量の測定

サンプル中のグリコーゲン含量は、F-キット D-グルコース (J.K. インターナショナル株式会社) を用いて測定した。まず、摘出した足底筋および肝臓を 3 ml の 0.3 M 過塩素酸 (和光純薬工業株式会社) でホモジナイズした。次に、40 μ l (骨格筋) および 22.5 μ l (肝臓) のホモジネートを 750 μ l の 1 M 塩酸 (和光純薬工業株式会社) に加え、2 時間、100°C で加温することでグリコーゲンのグルコシド結合を分解し、ホモジネート中のグリコーゲン全てをグルコースへと分解した。加熱後、室温に戻してから、750 μ l の 1 M 水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社) を加えて中和した。中和したサンプルを 1.5 ml キュベットに 800 μ l 移し、溶液 I (110 mg NADP、260 mg ATP、Triethanolamine buffer pH7.6、硫酸マグネシウムおよび安定化剤を 45 ml の超純水で溶解した溶液) を 400 μ l 加え、よく混合した後に 340 nm の吸光度を分光光度計 (NanoDrop 2000c, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社) で測定した。測定後、更に溶液 II (320 U ヘキソキナーゼおよび 160 U グルコース 6 リン酸脱水素酵素) を 10 μ l 加え、よく混合した後に 15 分間、室温で静置し、再度 340 nm の吸光度を測定した。酵素反応前後の吸光度の変化量を算出し、スタンダードから算出した検

量線から筋湿重量あたりのグリコーゲン含量 (μ mol/g wet tissue) を求めた。

(4) 骨格筋および肝臓トリグリセライド含量の測定

サンプル中のトリグリセライド含量は、Folch らの方法 (1957) に基づき、トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。まず、摘出した足底筋および肝臓を 3 ml の 0.9% 塩化ナトリウム (SIGMA-Aldrich 社) 溶液でホモジナイズした。次に、クロロホルム (SIGMA-Aldrich 社) とメタノール (和光純薬工業株式会社) を 2 : 1 の割合で混合した、クロロホルム・メタノール混液 5 ml と 1 ml のホモジネートをポリプロピレン コニカル・チューブ (Becton, Dickinson and Company) に加え、260 rpm、1 時間、室温で攪拌 (SHAKER SR-1, アズワン株式会社) した。攪拌終了後、2000 rpm、10 分間、室温で遠心分離 (KUBOTA 5100, 株式会社久保田製作所) を行い、メタノール層、夾雑物層およびクロロホルム層 (Folch 液) の 3 層に分離した。3 ml の Folch 液を 5 ml ガラス管に採取し、ドラフト内で蒸発乾固するまで静置した。乾固後、2-プロパノール (和光純薬工業株式会社) とトリトン-X (Alfa Asear 社) を 9 : 1 の割合で混合した、イソプロトリトン X を 200 μ l (足底筋) もしくは 300 μ l (肝臓) 加えてよく混合し、トリグリセライド測定サンプルとした。トリグリセライド含量の測定は、5 μ l の測定サンプルと 750 μ l の発色試液を用い、4- (1) -iv と同様の方法を用いて実施した。

(5) 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で示し、群間の比較には t 検定を用いた。OGTT における血漿グルコースおよびインスリン濃度に関しては、統計処理に SPSS (日本アイ・ビー・エム株式会社) を用い、時間と食餌条件の二要因による二元配置分散分析を行った。危険率が 5%未満をもって有意とし、二元配置分散分析の結果、交互作用がみられたものに関しては最小有意差法を用いて多重比較検定の検定を行った。

Table 3-1. Compositions of the experimental diets

Ingredient	Dietary group	
	Con	HPCF
	(g/kg)	
Cornstarch	499.486	0
Sucrose	100	0
Casein	200	799.486
Rapeseed oil	100	100
Cellulose	50	50
AIN-93G mineral mix	35	35
AIN-93 vitamin mix	10	10
L-Cystine	3	3
Choline hydrogen tartrate	2.5	2.5
<i>Tert</i> -butylhydroquinone	0.014	0.014

Ⅲ. 結果

1. 体重、各臓器重量、摂餌量、飼料効率

解剖時における各臓器重量と、摂餌量および食餌効率の結果を Table 3-2 に示した。

また、体重 100g あたりの相対的な臓器重量を Table 3-3 に示した。

体重は、Con 群と比較して HPCF 群では 14%有意に低い値を示した ($p<0.01$)。Con 群と比較して、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪および腸間膜脂肪重量は HPCF 群において、それぞれ 47%、48%および 48%有意に低い値を示した ($p<0.01$)。これらの脂肪重量を合計した腹腔内脂肪合計重量についても、HPCF 群において 48%有意に低い値を示した ($p<0.01$)。また、体重 100g あたりの各腹腔内脂肪および合計重量においても、HPCF 群において有意に低い値を示した ($p<0.01$)。肝臓重量は、両群の間に有意な差は認められなかった一方で、体重 100g あたりの相対的な肝臓重量は Con 群と比較して HPCF 群において 20%有意に高い値を示した ($p<0.01$)。右腎と左腎を合計した腎臓合計重量については、HPCF 群において 50%有意に高い値を示した ($p<0.01$)。また、体重 100g あたりの腎臓合計重量に関しても、HPCF 群において有意に高い値を示した ($p<0.01$)。他の臓器とは異なり、ヒラメ筋重量および体重 100g あたりのヒラメ筋重量には両群の間に有意な差は認められなかった。

1 日あたりの摂餌量は、Con 群と比較して HPCF 群では 16%有意に低い値を示した ($p<0.01$)。また、飼料効率については、両群の間に有意な差は認められなかった。

2. 血液生化学的項目

(1) 空腹時血漿グルコース、インスリン濃度および HOMA-IR

空腹時血漿グルコース、インスリン濃度および HOMA-IR を Table 3-4 に示した。空腹時血漿グルコースおよびインスリン濃度と、これらの値から算出された HOMA-IR については、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-4)。

(2) 空腹時血漿トリグリセライドおよび遊離脂肪酸濃度

空腹時血漿トリグリセライドおよび遊離脂肪酸濃度を Table 3-4 に示した。血漿トリグリセライド濃度は、両群の間に有意な差は認められなかった。また、血漿遊離脂肪酸濃度についても、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-4)。

(3) OGTT における血漿グルコース濃度および曲線下面積

OGTT における血漿グルコース濃度および曲線下面積を Fig 3-1 に示した。二元配置分散分析の結果、食餌条件と時間における交互作用はみられなかったが、食餌条件による主効果が認められ、HPCF 群は Con 群より有意に低い値を示した ($p<0.01$) (Fig 3-1)。

血漿グルコース曲線下面積は、Con 群と比較して HPCF 群で 18%有意に低い値を示した ($p<0.05$) (Fig 3-1)。

(4) OGTT における血漿インスリン濃度および曲線下面積

OGTT における血漿インスリン濃度および曲線下面積を Fig 3-2 に示した。二元配置分散分析の結果、食餌条件と時間における交互作用はみられなかったが、食餌条件による主効果が認められ、HPCF 群は Con 群より有意に低い値を示した ($p<0.01$) (Fig 3-2)。

血漿インスリン曲線下面積は、Con 群と比較して HPCF 群で 36%有意に低い値を示した ($p<0.05$) (Fig 3-2)。

3. 骨格筋 GLUT-4、副睾丸脂肪 GLUT-4 および空腸 GLUT-2 含量

(1) 骨格筋 GLUT-4 含量

ヒラメ筋の GLUT-4 含量を Fig-3-3 に示した。ヒラメ筋の GLUT-4 含量は、両群の間に有意な差は認められなかった (Fig 3-3)。

(2) 副睾丸脂肪 GLUT-4 含量

副睾丸脂肪の GLUT-4 含量を Fig-3-4 に示した。副睾丸脂肪の GLUT-4 含量は、Con 群と比較して HPCF 群では 61%有意に高い値を示した ($p<0.01$) (Fig 3-4)。

(3) 空腸 GLUT-2 含量

空腸の GLUT-2 含量を Fig-3-5 に示した。空腸の GLUT-2 含量は、Con 群と比較して HPCF 群で 25%有意に低い値を示した ($p<0.01$) (Fig 3-5)。

4. 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量

足底筋および肝臓のグリコーゲン含量を Table 3-5 に示した。足底筋のグリコーゲン含量は、両群の間に有意な差は認められなかった。また、肝臓グリコーゲン含量についても、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-5)。

5. 骨格筋および肝臓トリグリセライド含量

足底筋および肝臓のトリグリセライド含量を Table 3-5 に示した。足底筋のトリグリセライド含量は、両群の間に有意な差は認められなかった。また、肝臓のトリグリセライド含量についても、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-5)。

Table 3-2. Body weight, intra abdominal fat, liver and kidney weight and food intake and food efficiency of rats after 6-wk ad libitum feeding of Con or HPCF diet.

	Con	HPCF
Initial body weight (g)	221.4 ± 2.3	221.7 ± 3.1
Final body weight (g)	559.6 ± 14.7	488.4 ± 12.3**
Food intake (g/day)	26.8 ± 0.7	22.6 ± 0.6**
Food efficiency (%)	28.3 ± 0.4	26.8 ± 0.5
		(g)
Intra abdominal fat		
Epididymal	13.3 ± 1.3	7.1 ± 0.7**
Retroperitoneal	18.0 ± 1.4	9.3 ± 1.1**
Mesenteric	12.2 ± 1.0	6.4 ± 0.5**
Total	43.5 ± 3.6	22.8 ± 2.2**
Liver	19.8 ± 0.9	20.8 ± 0.8
Kidney	3.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1**
		(mg)
Soleus muscle	175.4 ± 9.9	159.3 ± 4.3

Values are means ± SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of p<0.01.

Table 3-3. Relative weights of intra abdominal fat, liver and kidney in rats after 6-wk ad libitum feeding of either Con or HPCF diet.

	Con	HPCF
	(g/100g Body weight)	
Intra abdominal fat		
Epididymal	2.36 ± 0.20	1.45 ± 0.13**
Retroperitoneal	3.19 ± 0.18	1.88 ± 0.19**
Mesenteric	2.17 ± 0.14	1.31 ± 0.10**
Total	7.73 ± 0.49	4.64 ± 0.39**
Liver	3.53 ± 0.10	4.25 ± 0.11**
Kidney	0.60 ± 0.02	0.90 ± 0.02**
	(mg/100g Body weight)	
Soleus muscle	31.1 ± 1.2	32.7 ± 0.8

Values are means ± SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of p<0.01.

Table 3-4. Fasting plasma glucose, insulin, triglyceride and FFA concentrations and HOMA-IR in rats after 6-wk ad libitum feeding of either Con or HPCF diet.

	Con	HPCF
Glucose (mg/dL)	102.7 ± 3.6	98.9 ± 5.5
Insulin (pmol/L)	133.4 ± 37.4	75.6 ± 21.6
HOMA-IR	34.9 ± 10.1	19.9 ± 6.8
Triglyceride (mg/dL)	166.2 ± 20.6	120.0 ± 27.6
FFA (mEq/L)	1.16 ± 0.05	1.16 ± 0.01

Values are means ± SEM, n=7.

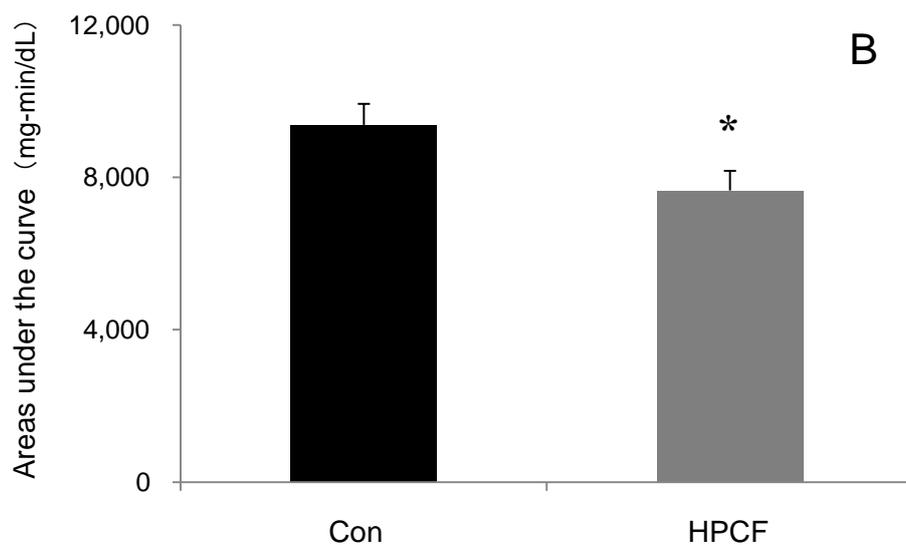
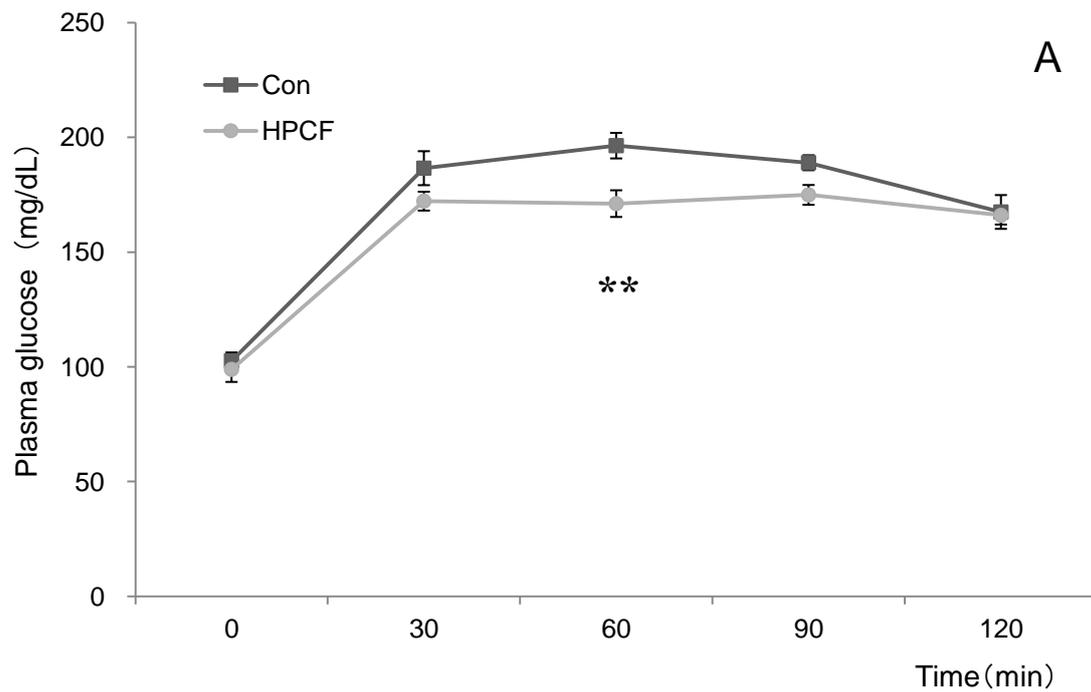


Fig 3-1. Plasma glucose responses after oral glucose administration (2 g/kg of body weight) in rats fed ad libitum with Con or HPCF diet for 6 wk (A). The Areas under the curves for plasma glucose during the 120-min period after oral glucose administration was calculated in accordance with the trapezoidal rule (B). Values are means \pm SEM, n=7. * and ** indicates significant difference from the values obtained in control group at levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

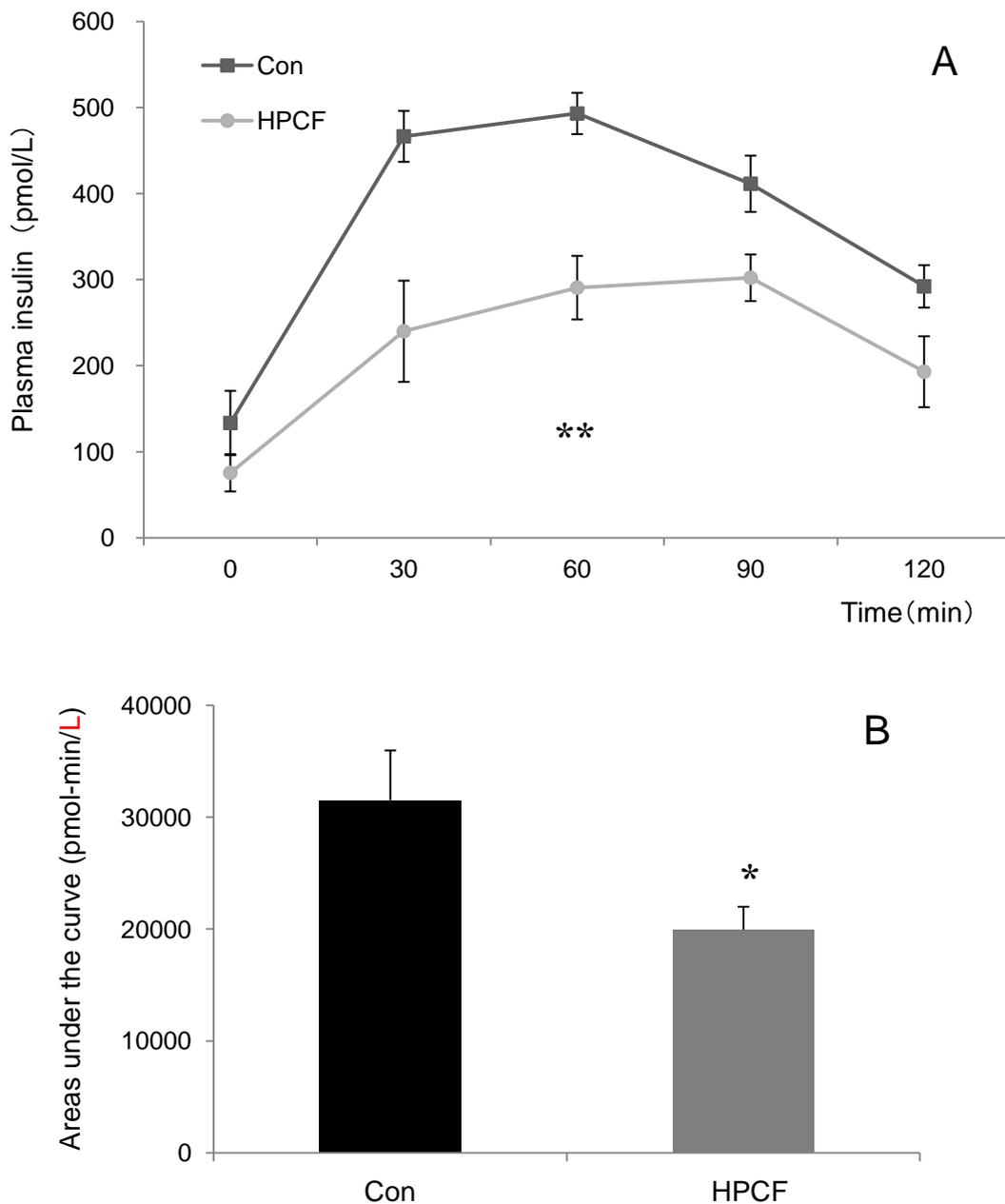


Fig 3-2. Plasma insulin responses after oral glucose administration (2 g/kg of body weight) in rats fed ad libitum with Con or HPCF diet for 6 wk (A). The Areas under the curves for plasma insulin during the 120-min period after oral glucose administration was calculated in accordance with the trapezoidal rule (B). Values are means \pm SEM, n=7. * and ** indicates significant difference from the values obtained in control group at levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

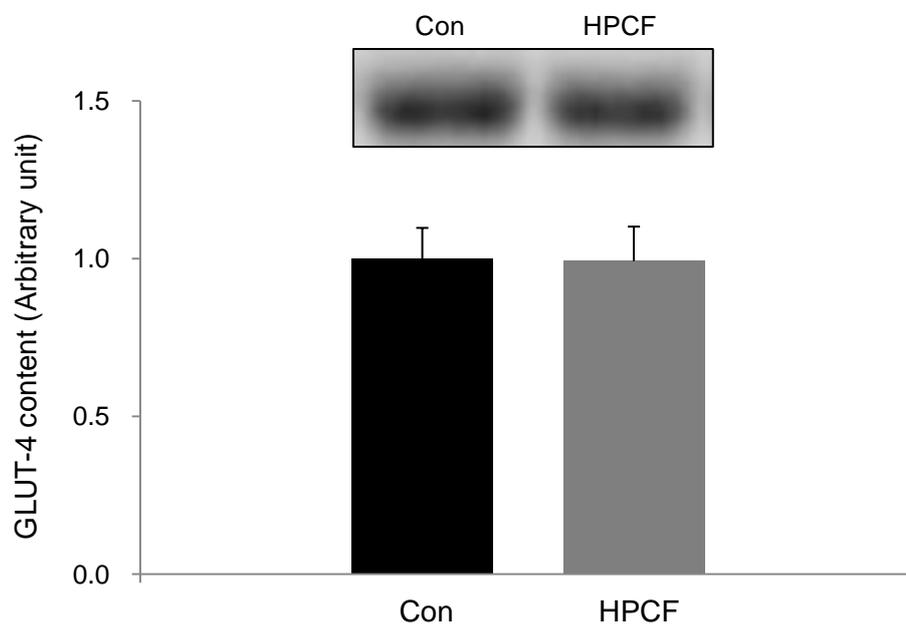


Fig 3-3. GLUT-4 content in soleus muscle of rats fed ad libitum with Con or HPCF diet for 6 wk. Values are means \pm SEM, n=7.

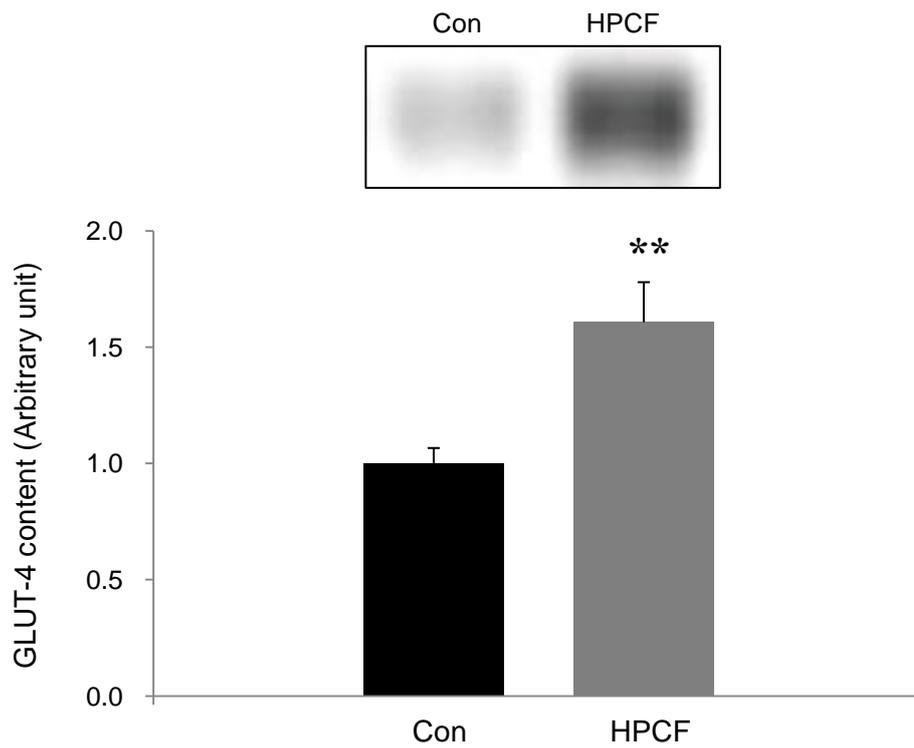


Fig 3-4. GLUT-4 content in epididymal fat of rats fed ad libitum with Con or HPCF diet for 6 wk. Values are means \pm SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of $p < 0.01$.

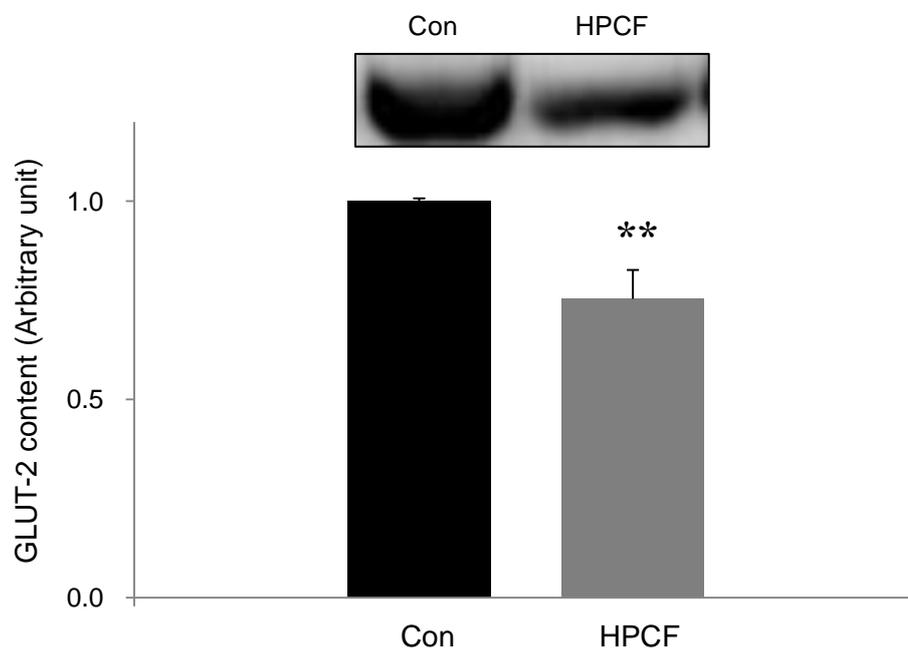


Fig 3-5. GLUT-2 content in jejunum of rats fed ad libitum with Con or HPCF diet for 6 wk. Values are means \pm SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of $p < 0.01$.

Table 3-5. Glycogen and triglyceride concentrations in plantaris muscle and liver of rats fed ad libitum feeding with either Con or HPCF diet for 6 wk.

	Con	HPCF
	($\mu\text{mol/g}$ wet tissue)	
Muscle glycogen	10.2 \pm 3.1	15.7 \pm 2.3
Liver glycogen	237.4 \pm 17.5	235.1 \pm 23.9
	(mg/g wet tissue)	
Muscle triglyceride	1.06 \pm 0.22	0.85 \pm 0.09
Liver triglyceride	9.67 \pm 1.70	6.53 \pm 1.16

Values are means \pm SEM, n=7.

研究課題 2 無糖質食がラットの糖代謝能に及ぼす影響 -ペアフィーディング条件による検討-

I. 目的

研究課題 1 において、HPCF 群のラットでは、良好な耐糖能を示すことが明らかとなった。しかしながら、研究課題 1 においては、HPCF 群が Con 群と比較して有意に低い摂餌量を示したことから、研究課題 1 で示された結果が食餌組成の違いによるものでなく、摂餌量の差（カロリー制限）によるものである可能性が考えられる。従って、研究課題 2 では、ペアフィーディング法を用いて両群の摂餌量および摂取エネルギー量を同等とした条件下において、糖質制限食がラットの糖代謝能に及ぼす影響を検討することを目的とした。

II. 方法

1. 実験動物および飼育条件

本研究課題では、Con 群(n=7)の前日摂取した食餌量と同じ餌重量を HPCF 群(n=7)に翌日給餌するペアフィーディング法を用い、両群間における摂餌量を同量とした検討を行った。

研究課題 1 と同様の 5 週齢のラットを用い、6 日間の予備飼育期間終了後、体重および予備飼育期間の体重増加量と飼料効率の平均値と標準誤差が類似したペアを 7 組作成した。ペアフィーディング開始初日には、研究課題 1 における HPCF 群の 1 日目の平均摂餌量を予想摂餌量として Con 群へ給餌した。2 日目より、それぞれのペアにおける Con 群の前日摂餌量と同じ餌重量を HPCF 群に翌日給餌することで、両群間の摂餌量を同量とした。また、他の飼育条件については、研究課題 1 と同様の方法を用いて実施した。なお、本実験は早稲田大学スポーツ科学部実験委員会の承認を得て行われた。

2. 経口糖負荷試験 (OGTT)

経口糖負荷試験は、飼育期間開始 6 週間後に、前日から 13 時間絶食させたラットに対して、課題 1 と同様の方法を用いて実施した。

3. 組織の摘出および保存

組織の摘出および保存は、OGTT 実施より 3 日後の午後 1 時から、研究課題 1 と同様の方法を用いて実施した。

4. 分析方法

(1) 血液生化学的項目

血漿グルコース濃度、インスリン濃度、遊離脂肪酸濃度、およびトリグリセライド濃度の測定は、課題 1 と同様の方法を用いて実施した。また、インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR)、グルコース曲線下面積およびインスリン曲線下面積の算出についても、研究課題 1 と同様の方法を用いて算出した。

(2) 骨格筋 GLUT-4、副睾丸脂肪 GLUT-4 および空腸 GLUT-2 含量の測定

骨格筋の GLUT-4、副睾丸脂肪の GLUT-4 および空腸の GLUT-2 タンパク含量の測定は、研究課題 1 と同様のホモジネート作成、サンプル調整、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびウェスタンブロッティングにより実施した。

(3) 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量の測定

骨格筋および肝臓グリコーゲン含量の測定は、研究課題 1 と同様の方法を用いて実施した。

(4) 骨格筋および肝臓トリグリセライド含量の測定

骨格筋および肝臓トリグリセライド含量の測定は、研究課題 1 と同様の方法を用いて実施した。

(5) 統計処理

統計処理は、研究課題 1 と同様の手法を用いて実施した。

III. 結果

1. 体重、各臓器重量、摂餌量、飼料効率

解剖時における各臓器重量と、摂餌量および食餌効率の結果を Table 3-6 に示した。また、体重 100g あたりの相対的な臓器重量を Table 3-7 に示した。

体重は、両群の間に有意な差は認められなかった。HPCF 群の副睾丸脂肪、後腹膜脂肪および腸間膜脂肪重量は Con 群と比べて、それぞれ 33%、44%および 34%有意に低い値を示した ($p<0.01$)。これらの脂肪重量を合計した腹腔内脂肪合計重量についても、HPCF 群において 38%有意に低い値を示した ($p<0.01$)。また、体重 100g あたりの各腹腔内脂肪および合計重量においても、HPCF 群で有意に低い値を示した ($p<0.01$)。肝臓重量は、Con 群と比較して HPCF 群で 37%有意に高い値を示した ($p<0.01$)。体重 100g あたりの相対的な肝臓重量も、Con 群と比較して HPCF 群において有意に高い値を示した ($p<0.01$)。右腎と左腎を合計した腎臓合計重量は、HPCF 群で 54%有意に高い値を示した ($p<0.01$)。また、体重 100g あたりの腎臓合計重量に関しても、HPCF 群で有意に高い値を示した ($p<0.01$)。他の臓器とは異なり、ヒラメ筋重量および体重 100g あたりのヒラメ筋重量では両群の間に有意な差は認められなかった。

1 日あたりの摂餌量は、両群の間に有意な差は認められなかった。また、飼料効率についても、両群の間に有意な差は認められなかった。

2. 血液生化学的項目

(1) 空腹時血漿グルコース、インスリン濃度および HOMA-IR

空腹時の血漿グルコース、インスリン濃度および HOMA-IR を Table 3-8 に示した。空腹時血漿グルコースおよびインスリン濃度と、これらの値から算出された HOMA-IR については、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-8)。

(2) 血漿遊離脂肪酸およびトリグリセライド濃度

空腹時血漿トリグリセライドおよび遊離脂肪酸濃度を Table 3-8 に示した。血漿遊離脂肪酸濃度は、両群の間に有意な差は認められなかった。また、血漿トリグリセライド濃度についても、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-8)。

(3) OGTT における血漿グルコース濃度および曲線下面積

OGTT における血漿グルコース濃度および曲線下面積を Fig 3-6 に示した。二元配置分散分析の結果、交互作用がみられたため多重比較検定を行った結果、投与後 60 分目では HPCF 群において有意に低い値を示し ($p < 0.01$)、120 分目では Con 群で有意に低い値を示した ($p < 0.01$) (Fig 3-6)。

血漿グルコース曲線下面積では、両群の間に有意な差は認められなかった (Fig 3-6)。

(4) OGTT における血漿インスリン濃度および曲線下面積

OGTT における血漿インスリン濃度および曲線下面積を Fig 3-7 に示した。二元配置分散分析の結果、食餌条件と時間における交互作用および食餌条件による主効果は認められなかった (Fig 3-7)。

血漿インスリン曲線下面積においても、両群の間に有意な差は認められなかった (Fig 3-7)。

3. 骨格筋 GLUT-4、副睪丸脂肪 GLUT-4 および空腸 GLUT-2 含量

(1) 骨格筋 GLUT-4 含量

ヒラメ筋の GLUT-4 含量を Fig-3-8 に示した。ヒラメ筋の GLUT-4 含量は、両群の間に有意な差は認められなかった (Fig 3-8)。

(2) 副睪丸脂肪 GLUT-4 含量

副睪丸脂肪の GLUT-4 含量を Fig 3-9 に示した。副睪丸脂肪の GLUT-4 含量は、Con 群と比較して HPCF 群で 36%有意に高い値を示した ($p<0.01$) (Fig 3-9)。

(3) 空腸 GLUT-2 含量

空腸の GLUT-2 含量を Fig 3-10 に示した。空腸の GLUT-2 含量は、Con 群と比較して HPCF 群で 36%有意に低い値を示した ($p<0.01$) (Fig 3-10)。

4. 骨格筋および肝臓グリコーゲン含量

足底筋および肝臓のグリコーゲン含量を Table 3-9 に示した。骨格筋グリコーゲン含量は、両群の間に有意な差は認められなかった。また、肝臓グリコーゲン含量については、Con 群と比較して HPCF 群で 122%有意に高い値を示した (Table 3-9)。

5. 骨格筋および肝臓トリグリセライド含量

足底筋および肝臓のトリグリセライド含量を Table 3-9 に示した。骨格筋トリグリセライド含量は、両群の間に有意な差は認められなかった。また、肝臓トリグリセライド含量についても、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-9)。

Table 3-6. Body weight, intra abdominal fat, liver and kidney weights and food intake, food efficiency of rats after 6-wk pair-feeding of Con or HPCF diet.

	Con	HPCF
Initial body weight (g)	250.9 ± 2.8	250.9 ± 1.8
Final body weight (g)	454.4 ± 9.0	470.6 ± 8.2
Food intake (g/day)	21.0 ± 0.3	21.0 ± 0.3
Food efficiency (%)	20.9 ± 0.5	22.7 ± 0.7
		(g)
Intra abdominal fat		
Epididymal	8.42 ± 0.56	5.60 ± 0.42**
Retroperitoneal	11.76 ± 0.45	6.61 ± 0.35**
Mesenteric	7.55 ± 0.44	5.02 ± 0.26**
Total	27.73 ± 1.05	17.23 ± 0.87**
Liver	13.68 ± 0.65	18.72 ± 0.93**
Kidney	2.78 ± 0.06	4.27 ± 0.13**
		(mg)
Soleus muscle	135.6 ± 4.6	153.0 ± 6.78

Values are means ± SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of p<0.01.

Table 3-7. Relative weights of intra abdominal fat, liver and kidney in rats after 6-wk pair-feeding of Con or HPCF diet.

	Con	HPCF
(g/100g Body weight)		
Intra abdominal fat		
Epididymal	1.86 ± 0.12	1.19 ± 0.08**
Retroperitoneal	2.60 ± 0.12	1.40 ± 0.07**
Mesenteric	1.66 ± 0.09	1.07 ± 0.05**
Total	6.11 ± 0.24	3.66 ± 0.15**
Liver	3.00 ± 0.10	3.97 ± 0.14**
Kidney	0.61 ± 0.02	0.91 ± 0.02**
(mg/100g Body weight)		
Soleus muscle	29.8 ± 0.6	32.5 ± 1.3

Values are means ± SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of p<0.01.

Table 3-8. Fasting plasma glucose, insulin, triglyceride and FFA concentrations and HOMA-IR in rats pair-fed either Con or HPCF diet for 6 wk.

	Con	HPCF
Glucose (mg/dL)	103.3 ± 6.9	101.0 ± 3.6
Insulin (pmol/L)	59.9 ± 11.7	62.1 ± 6.5
HOMA-IR	14.3 ± 2.6	15.6 ± 1.9
Triglyceride (mg/dL)	98.0 ± 14.3	68.5 ± 8.4
FFA (mEq/L)	1.12 ± 0.08	1.11 ± 0.13

Values are means ± SEM, n=7.

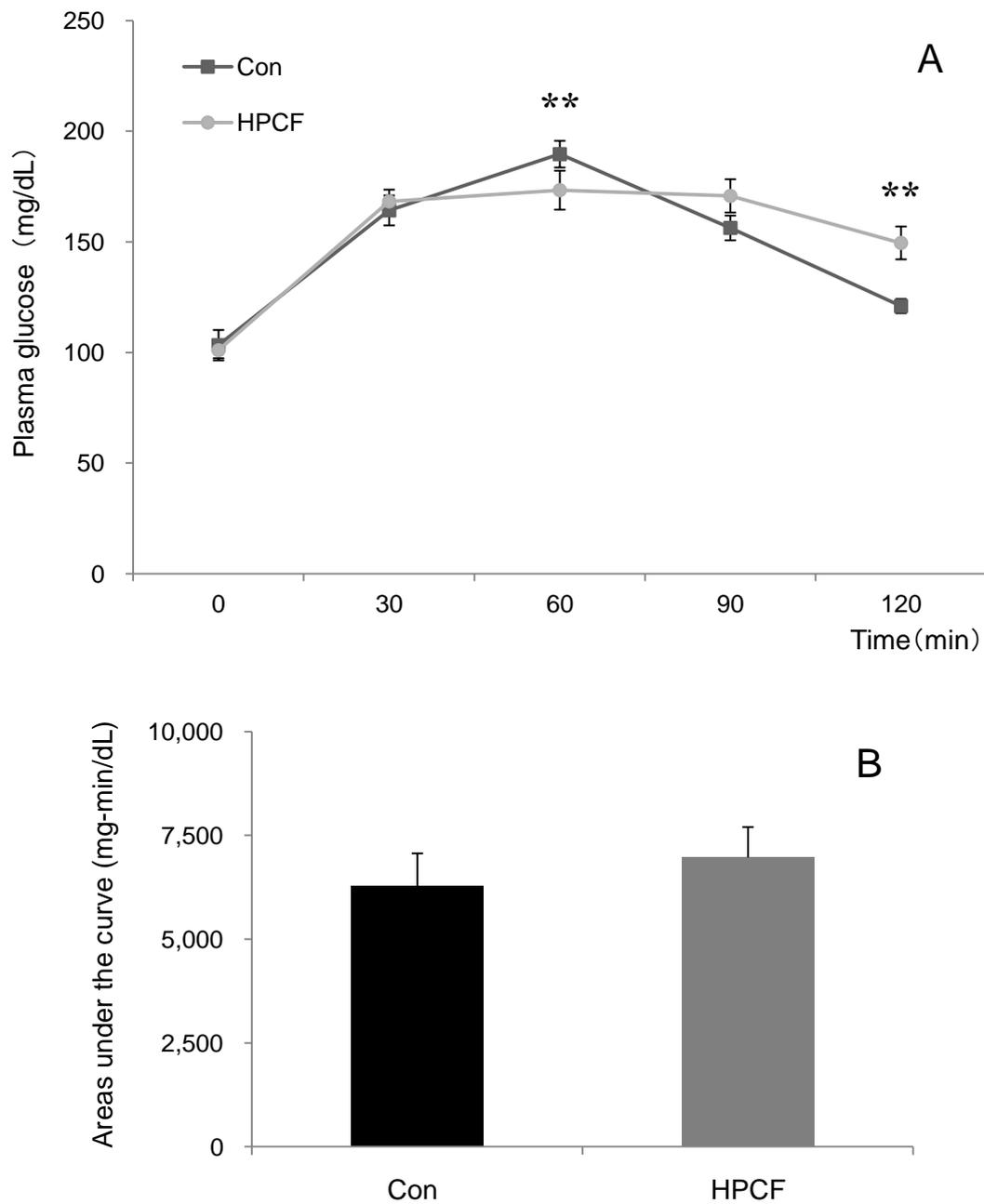


Fig 3-6. Plasma glucose responses after oral glucose administration (2 g/kg of body weight) in rats pair-fed either Con or HPCF diet for 6 wk (A). The Areas under the curves for plasma glucose during the 120-min period after oral glucose administration was calculated in accordance with the trapezoidal rule (B). Values are means \pm SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of $p < 0.01$.

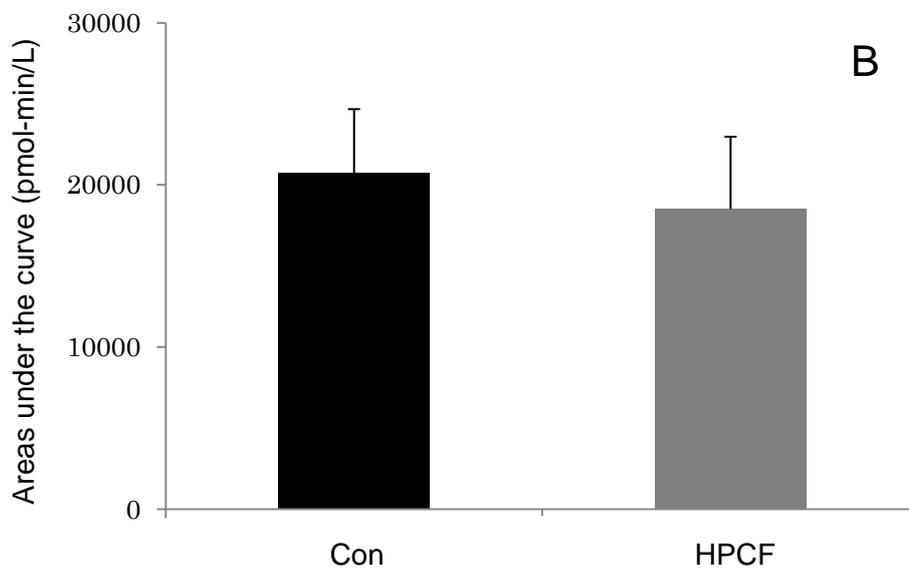
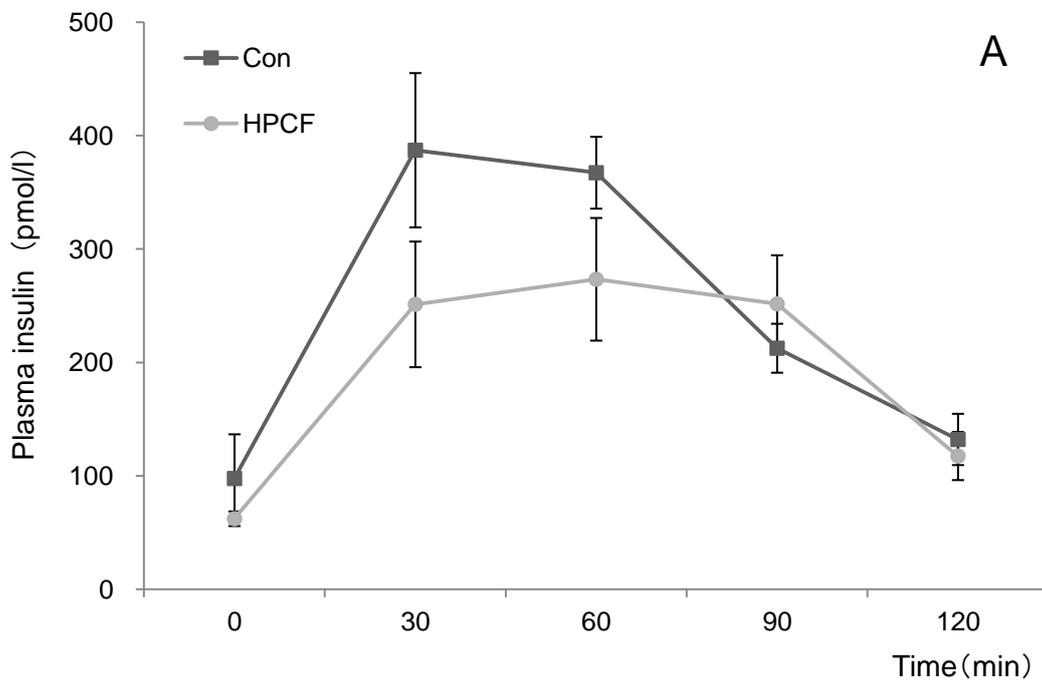


Fig 3-7. Plasma insulin responses after oral glucose administration (2 g/kg of body weight) in rats pair-fed either Con or HPCF diet for 6 wk (A). The Areas under the curves for plasma insulin during the 120-min period after oral glucose administration was calculated in accordance with the trapezoidal rule (B). Values are means \pm SEM, n=7.

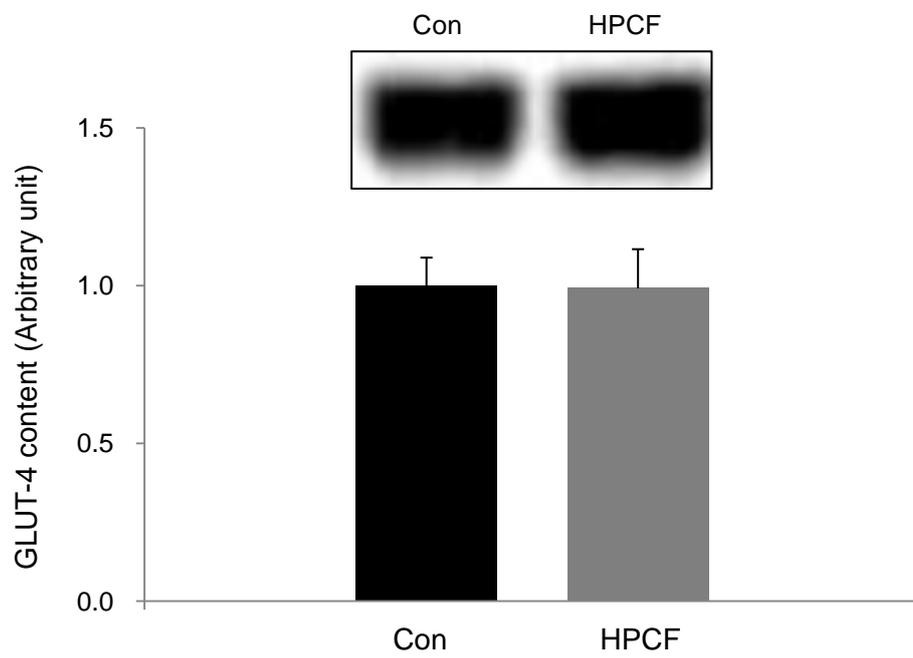


Fig 3-8. GLUT-4 content in soleus muscle of rats pair-fed either Con or HPCF diet for 6 wk. Values are means \pm SEM, n=7.

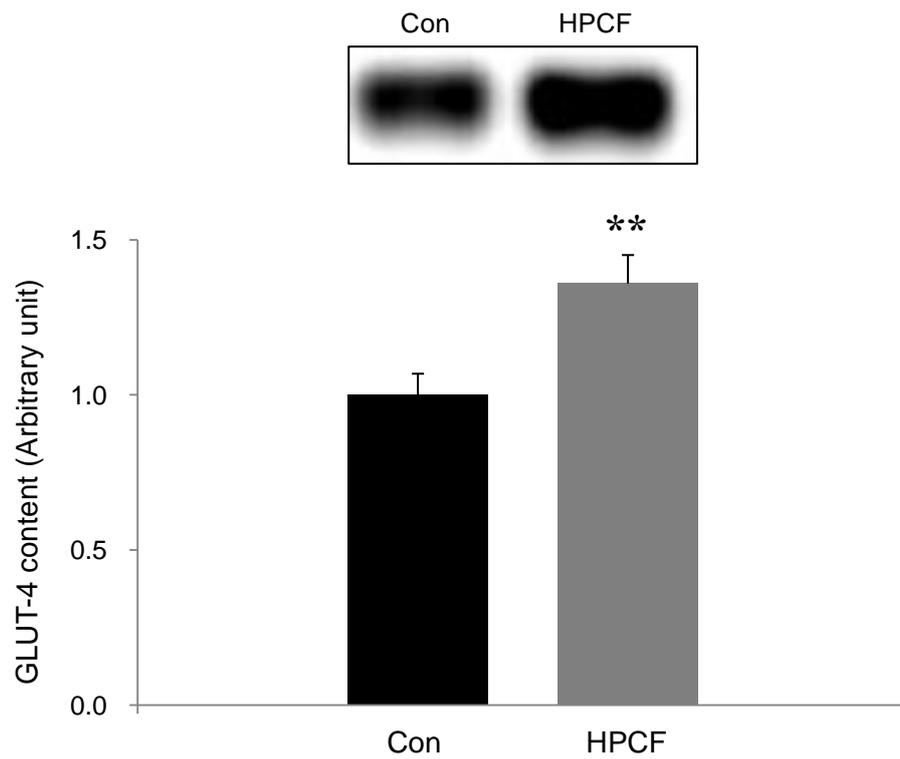


Fig 3-9. GLUT-4 content in epididymal fat of rat pair-fed either Con or HPCF diet for 6 wk. Values are means \pm SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of $p < 0.01$.

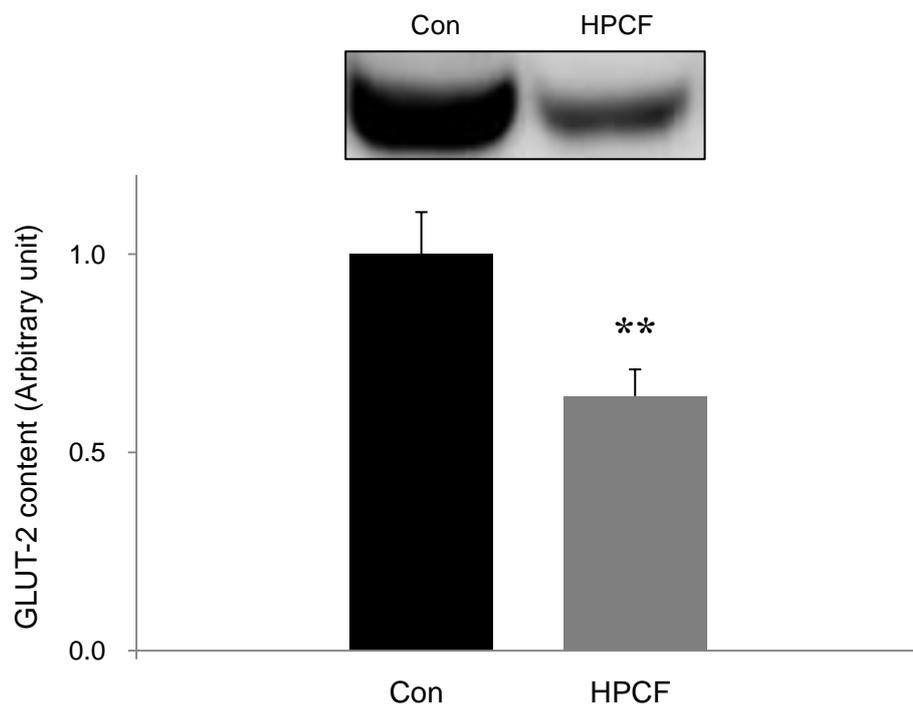


Fig 3-10. GLUT-2 content in jejunum of rat pair-fed either Con or HPCF diet for 6 wk.

Values are means \pm SEM, n=7. ** indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of $p < 0.01$.

Table 3-9. Glycogen and triglyceride concentrations in plantaris muscle and liver of rats pair-fed either Con or HPCF diet for 6 wk.

	Con	HPCF
	($\mu\text{mol/g}$ wet tissue)	
Muscle glycogen	5.48 \pm 2.32	5.05 \pm 0.83
Liver glycogen	89.6 \pm 21.2	194.4 \pm 26.7*
	(mg/g wet tissue)	
Muscle triglyceride	0.82 \pm 0.11	0.60 \pm 0.07
Liver triglyceride	4.38 \pm 0.52	5.94 \pm 1.12

Values are means \pm SEM, n=7. * indicates significant difference from the values obtained in Con group at a level of p<0.05.

IV 考察

本研究課題 1 および 2 で得られた主な知見は、糖質を最大限に制限した無糖質食を 6 週間摂取したラットにおいて、普通食群と比較して 1) 腹腔内脂肪量が有意に低い値を示し、さらに 2) 脂肪組織の GLUT-4 の増加および腸管の GLUT-2 の減少が生じるものの、3) 全身の耐糖能には大きな影響が認められない、ということである。

本課題では、糖質制限による糖代謝能への影響を検討するために、6 週間の給餌実験を行った。その結果、自由摂食条件を用いた研究課題 1 において、無糖質食を給餌した HPCF 群の腹腔内脂肪量は、Con 群と比較して有意に低い値を示した (Table 3-2)。ただし研究課題 1 では、Con 群に比べて HPCF 群において体重および摂餌量が有意に低い値を示し、さらに飼料による体重増加作用を表す指標となる飼料効率が両群の間で有意な差が認められなかったことから、摂餌量の差によって腹腔内脂肪量が低下した可能性も考えられた (Table 3-2)。そのため、研究課題 2 では、摂餌量の差による影響を除外するために、ペアフィーディング条件における検討を行った。その結果、Con 群と比較して HPCF 群の体重は両群の間に有意な差が認められなかった一方で、腹腔内脂肪重量が有意に低い値を示したことから、無糖質食が腹腔内脂肪量の蓄積を抑制する効果を持つことが明らかとなった (Table 3-6)。また、これらの結果は、高タンパク・無糖質食や、それよりも軽度な糖質制限食を用いた先行研究の結果と一致するものであった (Jean C, 2001、Klaus S, 2005 および Koide N, 2007)。HPCF 群において腹腔内脂肪量が低い値を示した理由としては、上述したように、糖質摂取により膵臓の β 細胞から分泌されるインスリンが脂肪合成作用を持つことが知られている (Klemm DJ, 2001) ため、糖質を制限した HPCF 群における食後のインスリン作用が低下することによって、腹腔内脂肪量が有意に低い値を示したことが考えられる。また、Kaufman LN (1986) は、本実験の食事組成と類似した高タンパク質食 (タンパク質エネルギー比 63%、脂質エネルギー比 8%および糖質エネルギー比 29%) を 5 日間摂取したラットにおける交感

神経系の活動が、普通食群と比較して高い値を示したことを報告している。脂肪組織はトリグリセライドとして脂質を蓄積しているが、このトリグリセライドは交感神経刺激によって遊離脂肪酸とグリセロールに分解され、血中に放出されることにより、各器官において消費されることが可能となる (Bartness TJ, 2007)。従って、HPCF 群における交感神経系の亢進が Con 群と比較して高くなることによって、脂肪組織における脂肪分解作用が促進されることにつながり、腹腔内脂肪量が低下した可能性も考えられる。また、ペアフィーディング条件において、HPCF 群の腹腔内脂肪重量が有意に低い値を示した一方で、肝臓および腎臓が Con 群と比較して有意に高い値を示したことから、ヒラメ筋重量においても高値を示す傾向 ($p < 0.08$) がみられたことから、HPCF 群における腹腔内脂肪以外の臓器重量が増加したことによって、両群の間に体重差が認められなかったと考えられる。

先行研究において、STZ 投与によりインスリン分泌能が顕著に低下したラットにおいて、骨格筋および脂肪組織における糖輸送体 GLUT-4 タンパク含量の低下が数多く報告されている (Kawanaka K, 1996 および Begum N, 1992)。これらの知見に基づき、本研究では、インスリン分泌を促す糖質を長期的に制限することで骨格筋および脂肪組織における GLUT-4 の発現量の低下、さらには全身の糖代謝能の悪化が生じるという仮説を立て、その検証を行った。その検証のために、まず、研究課題 1 として高タンパク・無糖質食を自由摂食条件下で飼育したラットにおいて経口糖負荷試験 (OGTT) を用いた耐糖能の評価を行った。その結果、OGTT 時における血漿グルコースおよびインスリン濃度と、それぞれの曲線下面積においては、予想に反して、HPCF 群が有意に低い値を示した (Fig 3-1 および 2)。この結果は、自由摂食条件において、HPCF 群は Con 群と比較して耐糖能が改善したことを示唆している。腹腔内脂肪量が高い場合、インスリン抵抗性が増加することがよく知られていることから、HPCF 群が良好な耐糖能を示した要因の 1 つとして、Con 群と比較して HPCF 群の腹腔内脂肪量が有意に低い値であることが考えられた (Table 3-2)。また、上述した仮説に反し、研究課題 1 では両群におけ

る骨格筋の GLUT-4 含量に差がみられなかったこと (Fig 3-3) から、長期的な糖質制限は、骨格筋の GLUT-4 含量に影響を及ぼさないことが示唆された。その一方で、副睾丸脂肪の GLUT-4 含量は、意外なことに、Con 群と比較して HPCF 群において有意に高い値を示した (Fig 3-4)。この結果から、HPCF 群において認められた高い耐糖能が、この脂肪組織における GLUT-4 含量の増加により生じた可能性が考えられた。また、糖吸収に関連する空腸の糖輸送体 GLUT-2 含量においては、Con 群と比較して HPCF 群が有意に低い値を示した (Fig 3-4)。この結果から、HPCF 群において腸管の糖吸収量が低下することにより、血糖の上昇が抑制された可能性が考えられる。また、糖質制限による腸管の糖輸送体能への影響を検討した先行研究において、Gouyou F (2003) は、高タンパク・無糖質食を 5 日間給餌したラットにおいて、高糖質食群と比較して腸管の GLUT-2 mRNA 量が有意に低い値を示すことを報告している。本実験において、HPCF 群における GLUT-2 タンパク質含量の低下が認められたことから、糖質制限による GLUT-2 mRNA の低下が、GLUT-2 タンパク質含量の低下につながるものが考えられる。以上のような研究課題 1 の結果から、HPCF 群における良好な耐糖能は、1) 腹腔内脂肪量が有意に低下したこと、2) 脂肪組織の GLUT-4 含量が増加し、脂肪組織の糖取り込み能が向上したこと、3) 腸管の GLUT-2 含量が低下し、腸管における糖吸収量が減少したことによって生じた可能性が考えられた。しかし一方で、上述したように、自由摂食条件では、Con 群と比較して HPCF 群において摂餌量が有意に低い値を示した。摂餌量の減少による糖代謝能の変化について、Cartee GD (1994) は、8~23 か月間、40% のカロリー制限を行ったラットにおいて、骨格筋の GLUT-4 含量に差が認められなかったにも関わらず、骨格筋の糖取り込み能が有意に高くなったことを示唆している。従って、HPCF 群において認められた高い耐糖能は、食餌組成による影響ではなく、摂餌量の低下によるものである可能性が考えられる。この影響を除くために、研究課題 2 では、ペアフィーディング法を用いて、両群の摂餌量を同等とした条件における糖代謝能への影響を検討した。その結果、自由摂食条件とは異なり、OGTT 時における血漿グルコー

スおよびインスリン濃度と、それぞれの曲線下面積は、両群の間に有意な差が認められなかった (Fig 3-6 および 7)。この結果から、自由摂食条件において認められた HPCF 群における高い耐糖能は、食餌組成の違いによるものではなく、摂餌量の差による影響である可能性が示唆された。このペアフィーディング条件において両群の耐糖能に差が生じなかった原因の 1 つとしては、自由摂食条件における HPCF 群の腹腔内脂肪量が Con 群として 48%低い値を示した (Table 3-2) のに対して、ペアフィーディング条件においては 38%低い値を示した (Table 3-6) ことから、ペアフィーディング条件では腹腔内脂肪量の差が自由摂食条件と比較して 10%程度少なかったために、耐糖能に対する影響が小さくなった可能性が考えられる。また、自由摂食条件と同様に、骨格筋の GLUT-4 含量が両群の間において有意な差が認められなかった (Fig 3-8) 一方で、副睾丸脂肪の GLUT-4 含量は Con 群と比較して HPCF 群において有意に高い値を示した (Fig 3-9)。これらの結果から、GLTU-4 タンパク含量において生じた影響は、食餌組成の違いによるものであることが考えられる。研究課題 2 において、副睾丸脂肪の GLUT-4 含量が増加しているにも関わらず、研究課題 1 のように両群の耐糖能に差が認められなかったことから、副睾丸脂肪において増加した GLUT-4 は糖代謝に影響を及ぼさないのかもしれない。もしくは、HPCF 群は脂肪組織の GLUT-4 含量が増加した一方で、腹腔内脂肪量の顕著な低下が認められたことから、脂肪組織の全体量が少ないことによって、両群の糖代謝能に有意な差が認められなかったという可能性も考えられる。

前述した、高タンパク質食が交感神経系を亢進させることに関連して、Fisher FM (2012) は寒冷刺激および交感神経刺激薬による交感神経系の活性化が、白色脂肪組織中の転写共役因子 Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC) -1 α を増加させることを報告している。さらに先行研究において、PGC-1 α が骨格筋の GLUT-4 を増加させること (Michael LF, 2001) も報告されていることから、HPCF 群では交感神経系の活性化に伴い、脂肪組織において PGC-1 α 、さらには GLUT-4 発現量が増加した可能性が考えられる。また、空腸の GLUT-2 含量に関しても、自由摂食条件と同様

に、Con 群と比べて HPCF 群において有意に低い値を示した (Fig 3-10) もの、副睾丸脂肪の GLUT-4 含量と同様に、GLUT-2 含量の低下と高い耐糖能における関連性は認められなかった。この結果から、本実験において認められた、腸管における糖輸送体量 GLUT-2 含量の変化は、糖代謝能に影響を及ぼさないか、もしくは他の要因によって糖代謝能への貢献が妨げられている可能性が考えられる。その候補としては、腸管に存在するもう 1 つのグルコース輸送体 SGLT-1 が挙げられる。前述したように、腸管のグルコース濃度が増加した場合、GLUT-2 は頂端膜と GLUT-2 小胞を移動することによって最大糖吸収量の調節を行っていることが示唆されている (Kellett GL, 2000)。しかしながら、Ferraris RP (1990) は、浸透圧から計算した値から、食餌による腸管のグルコース濃度が最大で 48 mM 程度になることを報告しており、さらに SGLT-1 が 30~50mM グルコース濃度において十分な糖吸収能を保持している (Kellett GL, 2000) ことから、食事条件下における腸管内のグルコース濃度が実験系で用いられる濃度よりも低い場合、GLUT-2 は最大糖吸収量に大きな影響を及ぼさない可能性が考えられる。従って、本研究でみられた空腸における GLUT-2 含量の変化は、生理的な条件下において糖代謝能に影響を及ぼさない可能性が考えられる。また、GLUT-2 の減少にともない、代償的に SGLT-1 が増加しているという可能性も考えられるため、今後、糖質制限による腸管の SGLT-1 含量への影響を、GLUT-2 含量に対する影響と共に検討していくことによって、糖質制限が腸管の糖輸送体発現量に及ぼす影響を明らかにすることができると考えられる。

また、安静時の血漿グルコース濃度については、自由摂食およびペアフィーディング条件の両検討において、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-4 および 8)。この結果は、糖質を最大限に制限した無糖質を摂取しても、安静時の血漿グルコース濃度に影響が生じないことを示唆している。この安静時の血漿グルコース濃度は、肝臓のグリコーゲンが分解され、血中に放出されることによって一定に保たれることが知られている (Nagle CA, 2009)。本実験において、肝臓のグリコーゲン含量は、HPCF 群に

において糖質が最大限に制限されていたにも関わらず、自由摂食条件においては、両群の間に有意な差が認められなかった (Table 3-5 および 9)。本実験では、肝臓のグリコーゲン合成に関わる要因を同定していないものの、HPCF 群は厳しい糖質制限に晒されていたことから、血漿グルコース濃度を維持するために必要な肝臓のグリコーゲン含量が、タンパク質からの糖新生によって維持されていたことが考えられる。また、自由摂食条件における結果とは異なり、ペアフィーディング条件においては、HPCF 群の肝臓グリコーゲン含量は、Con 群と比較して有意に高い値を示した。これは、自由摂食条件とペアフィーディング条件における HPCF 群の肝臓グリコーゲン含量の間に大きな差が認められなかった一方で、ペアフィーディング条件における Con 群の肝臓グリコーゲン含量が自由摂食条件と比べて低い値を示したことから、普通食における摂餌量 (糖質摂取量) の差による影響であることが示唆された。また、Con 群は食餌中の糖質量が HPCF 群と比較して多いため、HPCF 群と比較して、肝臓におけるグリコーゲン合成を亢進させなくても、腸管から吸収されたグルコースが、末梢組織に必要なグルコース量を供給している可能性が考えられる。従って、食餌から供給されるグルコースが肝臓の糖新生能力を亢進させないことによって、ペアフィーディング条件における Con 群の肝臓グリコーゲン含量が、HPCF 群と比べて低い値を示したことが考えられる。

肝臓グリコーゲンの血中への放出は、インスリンによって調節されている (Nagle CA, 2009)。本実験の結果、高タンパク・無糖質食を給餌されたラットにおける安静時の血漿インスリン濃度は、両検討において、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-4 および 8)。この結果は、高タンパク・無糖質食や、それよりも軽度な糖質制限食を用いた先行研究の結果と一致するものであった (Okitolonda W, 1988、Blouet C, 2006 および Sanchez RM, 2006)。さらに、安静時の血漿グルコースおよびインスリン濃度から算出された、肝臓におけるインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR (Radziuk J, 2000) についても、両群の間に差は認められなかった (Table 3-4 および 8)。これらの結果から、長期的な糖質制限は、肝臓のインスリン抵抗性に影響を及ぼさない可能性が

示唆された。しかしながら、ヒトを対象とした減量実験においては、厳しい糖質制限によって、普通食群よりも有意に HOMA-IR が低下することが報告されている (Kerksick CM, 2010 および Brinkworth GD, 2009)。前述した通り、この肝臓のインスリン抵抗性にはトリグリセライド含量が関係していると考えられているが、本実験の結果、肝臓のトリグリセライド含量は、両検討において、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-5 および 9)。ヒトを対象とした実験では肝臓のトリグリセライド含量が高いと推測される肥満者を被験者としているのに対して、本研究では、健常なラットを用いて検討を行ったことから、肝臓のトリグリセライド含量によるインスリン抵抗性への影響が認められなかった可能性が考えられる。

また、本課題では、骨格筋グリコーゲン含量が低下することにより、骨格筋のインスリン感受性が増加する (Jensen J, 1997) ことが知られていることから、骨格筋グリコーゲン含量の測定を行った。その結果、骨格筋グリコーゲン含量は、両検討条件において、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-5 および 9) ことから、骨格筋グリコーゲン含量の減少によって生じる糖代謝能への影響については、両群の間に差がなかったことが考えられる。さらに、骨格筋のトリグリセライド含量においても、自由摂食およびペアフィーディング条件の両検討において、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3-5 および 9)。この結果から、糖質制限は、骨格筋におけるインスリン作用の低下を引き起こすと考えられているトリグリセライドの蓄積 (Goodpaster BH, 2000 および Bachmann OP, 2001) を生じさせないことが示唆された。

また、血漿遊離脂肪酸 (FFA) やトリグリセライドは、骨格筋におけるインスリンシグナル伝達を阻害することや血管内皮細胞を硬直させることでインスリン作用に影響を及ぼすことが知られている (Boden G, 1994 および Semenkovich CF, 2006)。本研究では、両群の血漿 FFA およびトリグリセライド濃度に有意な差は認められなかった (Table 3-4 および 8)。したがって、糖質制限は血漿 FFA 濃度やトリグリセライドの増加を介して、糖代謝能に影響を及ぼすことがないと考えられる。

また、先述したように、腹腔内脂肪重量は Con 群と比較して HPCF 群において有意に低い値を示した一方で、HPCF 群では、他の臓器重量が高い値を示した。肝臓重量については、自由摂食条件では両群の間に有意な差が認められなかった (Table 3-2) 一方で、体重 100g あたりの相対的な肝臓重量については、HPCF 群において有意に高い値が示された (Table 3-3)。ペアフィーディング条件では、肝臓の絶対重量および体重 100g あたりの相対的な肝臓重量ともに、HPCF 群において有意に高い値を示した (Table 3-3 および 7)。グリコーゲンは、1g あたり 3g の水分子が結合することから、臓器中のグリコーゲン含量は臓器重量に影響を及ぼすことが知られている (Schmidt-Nielsen K, 1990)。本実験では、自由摂食条件において、肝臓重量およびグリコーゲン含量が両群の間に有意な差が認められなかった一方で、摂餌量の低下により、HPCF 群において体重が有意に低い値となったことから、肝臓全体に占めるグリコーゲン含量は変わらないものの、体重 100g あたりの相対的な肝臓重量が HPCF 群において高い値となった可能性が考えられる。また、ペアフィーディング条件においては、肝臓のグリコーゲン含量が HPCF 群において有意に高い値を示していることから、肝臓に含まれたグリコーゲン含量が肝臓重量に影響することによって、HPCF 群の肝臓重量が Con 群と比較して有意に高い値となったことが考えられる。

また、腎臓重量については、自由摂食およびペアフィーディング条件ともに、HPCF 群において有意に高い値を示した (Table 3-2、3、6 および 7)。高タンパク質食は尿素代謝量を増加させ、腎臓の糸球体濾過量を増加させることが報告されている (FD Seney, 1985) ことから、本実験で HPCF 群に給餌した高タンパク・無糖質食は、腎臓における負担が大きいことによって、腎臓の作業性肥大を生じさせた可能性が考えられる。一方で、Chen JK (2005) は、片腎を摘出したマウスにおいて、タンパク質合成を促進する働きを持つタンパク質キナーゼ mammalian target of rapamycin (mTOR) を介して、残された片腎の肥大が生じることを報告している。この腎臓を肥大させる作用を持つ mTOR は、ロイシンによって活性化することが知られている (Lynch CJ, 2001) ことに

加えて、高タンパク食によって血中のロイシン濃度が増加することが報告されている (Layman DK, 2004) ことから、本実験において認められた HPCF 群における腎肥大は、mTOR の活性化によって生じた可能性も考えられる。

第4章 まとめ

I. 研究目的

本研究の目的は、1) 長期間の厳しい糖質制限がラットの糖代謝能に及ぼす影響を明らかにすることと、2) 無糖質食を長期間摂取したラットの骨格筋および脂肪組織などにおける糖代謝関連分子群の発現量を分析することで、その効果のメカニズムを明らかにすることであった。

II. 結果

本研究課題によって得られた結果は、以下の通りである。

- 1) 自由摂取およびペアフィーディングの両食餌条件において、無糖質食摂取群の腹腔内脂肪量は普通食摂取群に比べて有意に低い値を示した。
- 2) 普通食群に比べて、無糖質食群の脂肪組織における GLUT-4 含量は有意に高い値を示し、また腸管の GLUT-2 含量は有意に低い値を示した。
- 3) 自由摂取条件では無糖質食摂取による耐糖能の改善が認められたが、ペアフィーディング条件では、両群間に差は認められなかった。

本研究において得られた知見をまとめると、糖質を最大限に制限した無糖質食の長期間の摂取は、腹腔内脂肪量を低下させる効果や、脂肪組織や腸管における糖輸送体含量に対して好ましい効果をもたらすものの、全身の糖代謝能には大きな影響を及ぼさない可能性が示唆された。

Ⅲ. 今後の課題

本研究課題では成長期のラットを用いて糖質制限による糖代謝能への影響を検討したが、糖質制限は主に肥満解消を目的として減量に用いられる食事療法であるため、肥満ラットにおける体組成および糖代謝能への影響を検討する必要があると考えられる。これにより、糖質制限によって認められた、腹腔内脂肪量の低下や、脂肪組織における GLUT-4 含量の増加および腸管における GLUT-2 含量の減少が、糖代謝能が低下した状態においてどのような影響を及ぼすかを明らかとすることができる。また、本研究で観察された GLUT-4 や GLUT-2 の変化を生じさせる分子メカニズムを解明することも重要になると思われる。さらに、HPCF 群では肝臓および腎臓の肥大が認められたことから、今後、無糖質食を実施する際の安全性に関する詳細な検討が必要であると考えられる。

引用・参考文献一覧

Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., and Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729-733.

Adams, J.M., 2nd, Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R.A., Sullards, M.C., and Mandarino, L.J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53, 25-31.

Baba, N.H., Sawaya, S., Torbay, N., Habbal, Z., Azar, S., and Hashim, S.A. (1999). High protein vs high carbohydrate hypoenergetic diet for the treatment of obese hyperinsulinemic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 1202-1206.

Bachmann, O.P., Dahl, D.B., Brechtel, K., Machann, J., Haap, M., Maier, T., Loviscach, M., Stumvoll, M., Claussen, C.D., Schick, F., et al. (2001). Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50, 2579-2584.

Bartness, T.J., and Song, C.K. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J Lipid Res* 48, 1655-1672.

Begum, N., and Draznin, B. (1992). Effect of streptozotocin-induced diabetes on GLUT-4 phosphorylation in rat adipocytes. *J Clin Invest* 90, 1254-1262.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature medicine* 7, 947-953.

Bergman, B.C., Hunerdosse, D.M., Kerege, A., Playdon, M.C., and Perreault, L. (2012). Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans. *Diabetologia* 55, 1140-1150.

Blouet, C., Mariotti, F., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Mathe, V., Tome, D., and Huneau, J.F. (2006). The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J Nutr* 136, 1849-1854.

Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J.V., and Rossetti, L. (1994). Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93, 2438-2446.

Brinkworth, G.D., Noakes, M., Buckley, J.D., Keogh, J.B., and Clifton, P.M. (2009). Long-term effects of a very-low-carbohydrate weight loss diet compared with an isocaloric low-fat diet after 12 mo. *Am J Clin Nutr* 90, 23-32.

Brinkworth, G.D., Noakes, M., Keogh, J.B., Luscombe, N.D., Wittert, G.A., and Clifton, P.M. (2004a). Long-term effects of a high-protein, low-carbohydrate diet on weight control and cardiovascular risk markers in obese hyperinsulinemic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 661-670.

Brinkworth, G.D., Noakes, M., Parker, B., Foster, P., and Clifton, P.M. (2004b). Long-term effects of advice to consume a high-protein, low-fat diet, rather than a conventional weight-loss diet, in obese adults with type 2 diabetes: one-year follow-up of a randomised trial. *Diabetologia* 47, 1677-1686.

Brozinick, J.T., Jr., Etgen, G.J., Jr., Yaspelkis, B.B., 3rd, Kang, H.Y., and Ivy, J.L. (1993). Effects of exercise training on muscle GLUT-4 protein content and translocation in obese Zucker rats. *Am J Physiol* 265, E419-427.

Cartee, G.D., Kietzke, E.W., and Briggs-Tung, C. (1994). Adaptation of muscle glucose transport with caloric restriction in adult, middle-aged, and old rats. *Am J Physiol* 266, R1443-1447.

Carvalho, E., Kotani, K., Peroni, O.D., and Kahn, B.B. (2005). Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E551-561.

Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L., and Summers, S.A. (2003). A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 278, 10297-10303.

Chen, J.K., Chen, J., Neilson, E.G., and Harris, R.C. (2005). Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 16, 1384-1391.

Clifton, P.M., Keogh, J.B., and Noakes, M. (2008). Long-term effects of a high-protein weight-loss diet. *Am J Clin Nutr* 87, 23-29.

Cnop, M., Havel, P.J., Utzschneider, K.M., Carr, D.B., Sinha, M.K., Boyko, E.J., Retzlaff, B.M., Knopp, R.H., Brunzell, J.D., and Kahn, S.E. (2003). Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46, 459-469.

Coen, P.M., Dube, J.J., Amati, F., Stefanovic-Racic, M., Ferrell, R.E., Toledo, F.G., and Goodpaster, B.H. (2010). Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. *Diabetes* 59, 80-88.

DeFronzo, R.A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., and Felber, J.P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30, 1000-1007.

Denton, R.M., and Randle, P.J. (1967). Concentrations of glycerides and phospholipids in rat heart and gastrocnemius muscles. Effects of alloxan-diabetes and perfusion. *Biochem J* 104, 416-422.

Douen, A.G., Ramlal, T., Rastogi, S., Bilan, P.J., Cartee, G.D., Vranic, M., Holloszy, J.O., and Klip, A. (1990). Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and

exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem* 265, 13427-13430.

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., et al. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103, 253-259.

Dube, J.J., Amati, F., Toledo, F.G., Stefanovic-Racic, M., Rossi, A., Coen, P., and Goodpaster, B.H. (2011). Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia* 54, 1147-1156.

Dyson, P.A., Beatty, S., and Matthews, D.R. (2007). A low-carbohydrate diet is more effective in reducing body weight than healthy eating in both diabetic and non-diabetic subjects. *Diabet Med* 24, 1430-1435.

Eriksson, J., Koranyi, L., Bourey, R., Schalin-Jantti, C., Widen, E., Mueckler, M., Permutt, A.M., and Groop, L.C. (1992). Insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and their relatives is not associated with a defect in the expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT-4) gene in human skeletal muscle. *Diabetologia* 35, 143-147.

Ferraris, R.P., Yasharpour, S., Lloyd, K.C., Mirzayan, R., and Diamond, J.M. (1990). Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am J Physiol*

259, G822-837.

Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 26, 271-281.

Fontana, L., Klein, S., and Holloszy, J.O. (2010). Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)* 32, 97-108.

Fraulob, J.C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2010). A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 46, 212-223.

Goodpaster, B.H., Kelley, D.E., Thaete, F.L., He, J., and Ross, R. (2000). Skeletal muscle attenuation determined by computed tomography is associated with skeletal muscle lipid content. *J Appl Physiol* 89, 104-110.

Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalet, V., Citadelle, D., Kellett, G.L., Thorens, B., Leturque, A., and Brot-Laroche, E. (2003). Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol* 552, 823-832.

Hansen, P.A., Gulve, E.A., Marshall, B.A., Gao, J., Pessin, J.E., Holloszy, J.O., and Mueckler, M. (1995). Skeletal muscle glucose transport and metabolism are enhanced in transgenic mice overexpressing the Glut4 glucose transporter. *J Biol Chem* 270, 1679-1684.

Henriksen, E.J., Bourey, R.E., Rodnick, K.J., Koranyi, L., Permutt, M.A., and Holloszy, J.O. (1990). Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am J Physiol* 259, E593-598.

Jean, C., Rome, S., Mathe, V., Huneau, J.F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C.L., and Tome, D. (2001). Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 131, 91-98.

Jensen, J., Aslesen, R., Ivy, J.L., and Brors, O. (1997). Role of glycogen concentration and epinephrine on glucose uptake in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* 272, E649-655.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation* 116, 1494-1505.

Kaufman, L.N., Young, J.B., and Landsberg, L. (1986). Effect of protein on sympathetic nervous system activity in the rat. Evidence for nutrient-specific responses. *J Clin Invest* 77, 551-558.

Kawanaka, K., Higuchi, M., Ohmori, H., Shimegi, S., Ezaki, O., and Katsuta, S. (1996). Muscle contractile activity modulates GLUT4 protein content in the absence of insulin. *Horm Metab Res* 28, 75-80.

Kellett, G.L., Brot-Laroche, E., Mace, O.J., and Leturque, A. (2008). Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr* 28, 35-54.

Kellett, G.L., and Helliwell, P.A. (2000). The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 350 Pt 1, 155-162.

Kerksick, C.M., Wismann-Bunn, J., Fogt, D., Thomas, A.R., Taylor, L., Campbell, B.I., Wilborn, C.D., Harvey, T., Roberts, M.D., La Bounty, P., et al. (2010). Changes in weight loss, body composition and cardiovascular disease risk after altering macronutrient distributions during a regular exercise program in obese women. *Nutr J* 9, 59.

Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52, 1779-1785.

Kim, J.K., Zisman, A., Fillmore, J.J., Peroni, O.D., Kotani, K., Perret, P., Zong, H., Dong, J., Kahn, C.R., Kahn, B.B., et al. (2001). Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest* 108, 153-160.

Kissebah, A.H. (1991). Insulin resistance in visceral obesity. *Int J Obes* 15 Suppl 2, 109-115.

Klaus, S. (2005). Increasing the protein:carbohydrate ratio in a high-fat diet delays the development of adiposity and improves glucose homeostasis in mice. *J Nutr* 135, 1854-1858.

Klemm, D.J., Leitner, J.W., Watson, P., Nesterova, A., Reusch, J.E., Goalstone, M.L., and Draznin, B. (2001). Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J Biol Chem* 276, 28430-28435.

Koide, N., Oyama, T., Miyashita, Y., and Shirai, K. (2007). Effects of calorie-restricted low-carbohydrate diet on glucose and lipid metabolism in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats. *J Atheroscler Thromb* 14, 253-260.

Kouidhi, S., Berrhouma, R., Rouissi, K., Jarboui, S., Clerget-Froidevaux, M.S., Seugnet, I., Bchir, F., Demeneix, B., Guissouma, H., and Elgaaied, A.B. (2011). Human subcutaneous adipose tissue Glut 4 mRNA expression in obesity and type 2 diabetes. *Acta Diabetol*.

Layman, D.K., and Baum, J.I. (2004). Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr* 134, 968S-973S.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lynch, C.J. (2001). Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies. *J Nutr* 131, 861S-865S.

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature medicine* 8, 731-737.

Maianu, L., Keller, S.R., and Garvey, W.T. (2001). Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5450-5456.

Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A.M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Forlani, G., and Melchionda, N. (1999). Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107, 450-455.

Matsuzawa, Y. (2008). The role of fat topology in the risk of disease. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7, S83-92.

Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional

coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3820-3825

Mora, S., Yang, C., Ryder, J.W., Boeglin, D., and Pessin, J.E. (2001). The MEF2A and MEF2D isoforms are differentially regulated in muscle and adipose tissue during states of insulin deficiency. *Endocrinology* 142, 1999-2004.

Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219, 713-725.

Nagle, C.A., Klett, E.L., and Coleman, R.A. (2009). Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res* 50 Suppl, S74-79.

Okitolonda, W., Brichard, S.M., Pottier, A.M., and Henquin, J.C. (1988). Influence of low- and high-protein diets on glucose homeostasis in the rat. *Br J Nutr* 60, 509-516.

Pedersen, O., Bak, J.F., Andersen, P.H., Lund, S., Moller, D.E., Flier, J.S., and Kahn, B.B. (1990). Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes* 39, 865-870.

Park, H.S., Park, J.Y., and Yu, R. (2005). Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes research and clinical practice* 69, 29-35.

Plomgaard, P., Nielsen, A.R., Fischer, C.P., Mortensen, O.H., Broholm, C., Penkowa, M., Krogh-Madsen, R., Erikstrup, C., Lindgaard, B., Petersen, A.M., et al. (2007). Associations between insulin resistance and TNF-alpha in plasma, skeletal muscle

and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 2562-2571.

Radziuk, J. (2000). Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 4426-4433.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C., Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123, 1939-1951.

Ren, J.M., Semenkovich, C.F., Gulve, E.A., Gao, J., and Holloszy, J.O. (1994). Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem* 269, 14396-14401.

Rodnick, K.J., Henriksen, E.J., James, D.E., and Holloszy, J.O. (1992). Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *Am J Physiol* 262, C9-14.

Sacks, F.M., Bray, G.A., Carey, V.J., Smith, S.R., Ryan, D.H., Anton, S.D., McManus, K., Champagne, C.M., Bishop, L.M., Laranjo, N., et al. (2009). Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med* 360, 859-873.

Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., and

Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279, 32345-32353.

Sanchez, R.M., Young, J.C., and Kruskall, L.J. (2006). Effect of a high protein diet on glucose tolerance in the rat model. *Life Sci* 79, 295-299.

Schmid, H., Kettelhut, I.C., and Migliorini, R.H. (1984). Reduced lipogenesis in rats fed a high-protein carbohydrate-free diet. *Metabolism* 33, 219-223.

Semenkovich, C.F. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 116, 1813-1822.

Seney, F.D., Jr., and Wright, F.S. (1985). Dietary protein suppresses feedback control of glomerular filtration in rats. *J Clin Invest* 75, 558-568.

Skov, A.R., Toubro, S., Ronn, B., Holm, L., and Astrup, A. (1999). Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 528-536.

Schmidt-nielsen, K. (1990). *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press. 602pp.

Steppan, C.M., and Lazar, M.A. (2002). Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13, 18-23.

Stratford, S., Hoehn, K.L., Liu, F., and Summers, S.A. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* 279, 36608-36615.

Timmers, S., Schrauwen, P., and de Vogel, J. (2008). Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav* 94, 242-251.

Tobin, V., Le Gall, M., Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A.G., Klein, C., Prigent, M., Serradas, P., Cuif, M.H., Magnan, C., et al. (2008). Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57, 555-562.

Toledo, F.G., Menshikova, E.V., Azuma, K., Radikova, Z., Kelley, C.A., Ritov, V.B., and Kelley, D.E. (2008). Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. *Diabetes* 57, 987-994.

Volek, J., Sharman, M., Gomez, A., Judelson, D., Rubin, M., Watson, G., Sokmen, B., Silvestre, R., French, D., and Kraemer, W. (2004). Comparison of energy-restricted very low-carbohydrate and low-fat diets on weight loss and body composition in overweight men and women. *Nutr Metab (Lond)* 1, 13.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.

Yamashita, S., Nakamura, T., Shimomura, I., Nishida, M., Yoshida, S., Kotani, K., Kameda-Takemura, K., Tokunaga, K., and Matsuzawa, Y. (1996). Insulin resistance and body fat distribution. *Diabetes care* 19, 287-291.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., et al. (2003). Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry* 278, 2461-2468.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature medicine* 7, 941-946.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤な御指導ならびに激励を賜りました本研究科の樋口満教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の村岡功教授および田口素子准教授には本論文を終えるにあたり、暖かい激励ならびに御指導を賜りましたことを心から御礼申し上げます。

本稿作成や大学院生活を様々な方面から支えてくださった、本研究科の河野寛助教、曹振波助教や樋口研究室の皆様にご心より感謝致します。

本論文作成のために大学院生活を物心両面で支えていただいた両親にご心より感謝致します。

最後に、本研究の遂行に際して、東京大学大学院総合文化研究科の寺田新准教授には、常に御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました。ここに心から感謝の意を表します。