

乳由来カルシウムの摂取が糖尿病モデルマウスの糖代謝および膵臓機能に及ぼす影響

著者	山中 千恵美
学位名	博士（生活科学）
学位授与機関	大妻女子大学
学位授与年度	2017
学位授与番号	32604博人甲第7号
URL	http://id.nii.ac.jp/1114/00006533/



学位論文の内容の要旨

報告番号 : 甲(又は乙) 第 7 号

学位申請者	山中 千恵美
論文題目	乳由来カルシウムの摂取が糖尿病モデルマウスの糖代謝および膵臓機能に及ぼす影響
審査委員	主査 青江 誠一郎
	副査 高波 嘉一
	副査 田中 直子
	上西 一弘 (女子栄養大学)

論文要旨

近年、カルシウムの摂取不足または乳製品の摂取量減少が耐糖能異常、2型糖尿病ならびにメタボリックシンドロームと関連があるという研究報告が発表された。これまでの申請者の研究結果からもカルシウムの摂取、特に乳由来のカルシウムの摂取が抗肥満作用および血糖上昇抑制作用を示すことが確認されている。しかし、そのメカニズムの詳細はわかっていない。そこで、乳由来カルシウムの摂取が耐糖能に及ぼす影響について、そのメカニズムを膵臓機能に着目し解明を試みた。また、全ての実験において実験動物は遺伝性2型糖尿病モデルマウスであるKK/Taマウスを用いて評価項目を統一して検討した。

第1章ではこれまでの申請者の研究と先行研究についてまとめた。第2章では、これまでの検討においてカルシウム摂取量の低下が耐糖能異常と関連があったことから、カルシウムの摂取量の違いが耐糖能および膵臓機能に及ぼす影響を検討した。飼料はAIN-93G組成を基本組成とし、カルシウム含量が0.25%、0.5%、1.0%となるように炭酸カルシウムを配合した。その結果、2型糖尿病モデルマウスにおいて、カルシウムの摂取が過不足のいずれにおいても膵臓機能に影響を与えることが示された。糖尿病の初期段階で慢性低カルシウム摂取は、膵臓での炎症を誘発し、インスリン抵抗性を促進することが認められた。また、高カルシウム摂取では、カルシウム摂取の低下とは異なり、血清PTH濃度が低下することで血清リン濃度が上昇し、インスリン抵抗性に影響した可能性が考えられた。

第3章では、乳中のカルシウムとサプリメントで用いられるカルシウムの作用の違いを調べるため、レンネットカゼインより乳中の主要なカルシウム形態であるミセル性リン酸カルシウム(MCP)とカゼインホスホペプチド(CPP)との複合体の調製を試みた。まず既報を元にレンネットカゼインにトリプシンを作用させてMCP-CPPの調製を試みたが、MCP-CPPは生成しなかった。そこで、トリプシンを用いずに酸性下でMCPをレンネットカゼインから分離し、別途CPPを加えることでMCP-CPPを調製する方法に改良した。HPLC分析の結果、既報のMCP-CPPと同等のMCP-CPPが調製できたことが確認できた。

第4章では、第3章で確立した方法を用いて調製したMCP-CPPを用い、その耐糖能および膵臓機能に及ぼす影響を検討した。飼料のカルシウム含量は0.5%として、糖尿病の初期段階の検

討を行うために10週間飼育を、糖尿病の進行期の検討を行うために12週間飼育を行った。その結果、10週間飼育では、ITT試験（インスリン投与試験）により、インスリン投与前、15分後、30分後の血糖値の値が炭酸カルシウム群に比べて、MCP-CPP群で有意に低値を示した。膵臓の機能に関わる mRNA 発現量では、インスリン分泌に関わる *Ins1*、*Ins2* の mRNA 発現量が、炭酸カルシウム群に比べて MCP-CPP 群で有意に低値を示した。膵臓の炎症に関わる mRNA 発現量では、*IL-1 β* 、*INF- γ* の mRNA 発現量が、炭酸カルシウム群に比べて MCP-CPP 群で有意に低値を示した。以上より、10週間飼育では、MCP-CPP の摂取は糖尿病の初期の膵臓機能の維持・亢進に影響することが示された。糖尿病が進展してくる12週間飼育では、糖尿病の悪化に伴い起こる膵臓での炎症を MCP-CPP は顕著に抑制することが示された。したがって、2型糖尿病モデルマウスである KK/Ta マウスにおいて、MCP-CPP 摂取は炭酸カルシウム摂取に比べて、インスリン抵抗性の進展が抑制され、糖尿病の進展に伴う膵臓での炎症が抑制されると考えられる。

第5章では、乳中のカルシウム形態である MCP-CPP と同様の組成をした組成塩を作成し、MCP-CPP 組成塩が耐糖能および膵臓機能に関して MCP-CPP と同様の作用を示すかを検討した。膵臓の機能に関わる mRNA 発現では、インスリン分泌に関わる *Ins1*、*Ins2* やその上流に位置する *PDX-1*、*MafA*、インクレチンの応答に関わる *GLP1-R* の mRNA 発現がコントロール群（炭酸カルシウムをカルシウム源）に比べて MCP-CPP 組成塩群、MCP-CPP 群で有意に低値を示し、膵臓での炎症に関わる *IL-6*、*TNF α* 、*MCP-1*、*IL-1 β* の mRNA 発現量も、コントロール群に比べて MCP-CPP 組成塩群、MCP-CPP 群で有意に低値を示した。本結果より、MCP-CPP 組成塩、MCP-CPP の摂取はともに、2型糖尿病モデルマウスの膵臓機能を維持し、膵臓での炎症を抑制することが確認され、MCP-CPP 組成塩と MCP-CPP の膵臓機能、炎症に関する効果が同等であることが認められた。

第6章では前述の結果から MCP-CPP と MCP-CPP 組成塩の効果が同等であることが確認できたため、MCP-CPP の耐糖能および膵臓機能に関する効果のメカニズムの一端を解明するため、MCP-CPP の組成中のカルシウム塩およびカゼインホスホペプチド (CPP) が耐糖能および膵臓機能に及ぼす影響を検討した。インスリン抵抗性ならびに膵臓の機能に関わる mRNA 発現量の結果、塩化カルシウムならびに MCP-CPP 組成塩で悪化が抑制された。膵臓の炎症に関わる mRNA 発現量は、*IL-6* の mRNA 発現量が炭酸カルシウム群、炭酸カルシウム+CPP 群、塩化カルシウム群に比べて MCP-CPP 組成塩群で有意に低値を示した。*MCP-1*、*INF- γ* の mRNA 発現量は、炭酸カルシウム群、炭酸カルシウム群+CPP 群に比べて MCP-CPP 組成塩群で有意に低値を示した。*IL-1 β* の mRNA 発現量は、炭酸カルシウム群に比べて MCP-CPP 組成塩群で有意に低値を示した。これらの結果より、炭酸カルシウム摂取よりも溶解してイオン化する塩化カルシウム摂取の方が膵臓の機能を維持し、炎症を抑制することが確認された。また、CPP の有無に関しては、炭酸カルシウムに CPP を加えても、膵臓機能や膵臓の炎症の改善は見られなかった。しかし、塩化カルシウムに CPP を加えることで、インスリンの分泌や膵臓の炎症をより顕著に抑制することが確認できた。

以上の検討より2型糖尿病モデルマウスにおいて、カルシウム摂取過不足のいずれにおいても異なるメカニズムで膵臓機能に影響を与えることが示された。乳中のカルシウムである MCP-CPP に関しては、炭酸カルシウムに比べて糖尿病初期段階では膵臓機能の維持・亢進が認められ、糖尿病が発展した段階では、膵臓の炎症抑制を示した。カルシウム塩と CPP の影響に関しては、炭酸カルシウムよりも塩化カルシウム（イオン化するカルシウム）の方が膵臓機能の維持や膵臓の炎症抑制に効果がみられた。CPP の影響に関しては、炭酸カルシウムに CPP を添加しても膵臓機能の改善や膵臓の炎症を抑制することは認められなかったが、塩化カルシウムに CPP を加えた MCP-CPP 組成塩では膵臓でのインスリン分泌や膵臓での炎症をより顕著に抑制することが示されたことから、イオン化カルシウムとホスホペプチドの両方の存在が膵臓機能の改善や膵臓での炎症抑制に効果があることが示された。