

国産ローヤルゼリーの肥満性糖尿病マウス（KK-Ay）における 肥満抑制効果並びに高血糖降下作用機構に関する研究

平成 29 年 5 月 12 日受付

吉 田 芽 生¹⁾
林 香 里¹⁾
渡 谷 理 沙¹⁾
古 藤 惇¹⁾
佐々木 大 樹²⁾
竹 内 実^{1,2,3)}
松 本 耕 三¹⁾

¹⁾ 京都産業大学総合生命科学部動物生命医科学科

²⁾ 京都産業大学工学研究科

³⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

要 旨

本研究は、ローヤルゼリー（RJ）が 2 型糖尿病の肥満を予防し、高血糖を改善できるかどうかを調べたものである。この研究では、肥満性 2 型糖尿病である KK-Ay マウスを利用した。RJ（10 mg/kg）を経口ゾンデを用い経口的に投与した。体重、血漿グルコースおよびインスリンレベルを測定した。mRN 発現レベルは定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を、またタンパク質発現レベルはウェスタンブロッティングをそれぞれ用いて決定した。5 週間の RJ 投与は、体重増加を部分的に抑制し、高血糖を改善した。不思議なことにインスリン抵抗性は改善しなかった。RJ 投与は、腹部脂肪におけるアディポネクチン（AdipoQ）発現、肝臓におけるアディポネクチン受容体-1（AdipoR1）発現、および KK-Ay マウスの肝臓におけるグルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase）レベルを抑制するリン酸化 Amp 活性化タンパク質キナーゼ（pAMPK）発現を誘導した。実際、RJ 投与は、肝臓におけるグルコース新生の重要な酵素である G6Pase の mRNA 発現を抑制した。骨格筋においても pAMPK レベルは増加したが、RJ 投与群ではグルコーストランスポーター-4（Glut4）の細胞表面への移動は増加しなかった。RJ の長期投与による高血糖の改善は、肝臓での pAMPK タンパク質発現をアップレギュレートすることによる糖新生の抑制、即ち G6Pase 発現の抑制に起因すると考えられた。なお、ここに示される主なデータは Yoshida, Hayashi et al., J. Vet. Med. Sci. 79, 299–307 2017 に掲載された英語原著論文からのデータを引用している。

キーワード：ローヤルゼリー、2 型糖尿病、肥満、高血糖、KK-Ay マウス

序 論

2 型糖尿病は、座りがちな生活習慣や過剰な食事摂取などの環境的および行動的要因によって引き起こされる¹⁾。肥満は 2 型糖尿病の発症に関連しており²⁾、遺伝的素因と肥満がこの疾患の主要な危険因子であり³⁾、これら 2 つの因子間の相互作用はおそらく 2 型糖尿病の発症に関係する。肥満は、インスリン抵抗性を発症するリスク増加につながる⁴⁾。2 型糖尿病の主要な原因は、肥満に伴う脂肪組織、肝臓、および骨格筋におけるインスリン作用の障害の結果であると考えられている。膵 β 細胞がインスリン感受性の低下を完全に補うことができないときに過度の高血糖が発症することになる⁵⁾。

現在、肥満患者の 2 型糖尿病の改善および制御には、薬物療法および生活習慣の改善がとられている。食物制限および運動訓練は、肥満糖尿病モデルラットにおける糖尿病を予防または治療するのに有効であることが知られている^{6,7)}。さらに糖尿病の相補的治療としての有用な食物成分の利用も提案されている。その一つがロイヤルゼリー (RJ) であり、RJ にはいくつかの薬理効果が知られている。RJ 摂取により、平均体重⁸⁾、平均空腹時血糖、および平均グリコシル化ヘモグロビン (HbA1c) レベルを有意に低下させ、糖尿病女性患者における平均インスリン濃度を上昇させた⁹⁾。また Shidfar et al. (2015) は、プラセボ摂取と比較して、RJ 摂取量が血清グルコースおよびインスリンレベルならびに恒常性モデル評価のインスリン抵抗性 (HOMA-IR) 値を改善させる傾向があることを報告している。さらに、RJ 摂取群では、血清中の全抗酸化能が男性および女性患者において有意に増加した¹⁰⁾。RJ は、フルクトース摂取ラットにおいて高インスリン血症およびインスリン抵抗性を改善する能力を有する¹¹⁾。これらの報告は、RJ 摂取が 2 型糖尿病に伴う高血糖およびインスリン抵抗性を改善することを示唆している。しかし、関与する分子機構は不明である。ヒトにおける RJ 投与に伴う 2 型糖尿病の改善のための分子メカニズムの直接的調査は困難であるため、近交系動物モデルを用いることはそのような研究に極めて有用である¹²⁾。

本研究では、肥満 / 糖尿病の KK-Ay マウスに対する RJ 投与の効果、および RJ 投与が高血糖を改善するメカニズムについて研究した。結果は、RJ 投与によりアディポネクチン (AdipoQ) およびアディポネクチン受容体-1 (AdipoR1) mRNA 発現が増強され、リン酸化された Amp 活性化プロテインキナーゼ (pAMPK) 活性化をもたらし得ることを示唆した。さらに、活性化された pAMPK は、糖新生によるグルコース産生の最終段階で機能するグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) の発現を抑制し、KK-Ay マウスにおける高血糖を改善したと考えられた。さらに、ペロキシソーム増殖因子活性化受容体 (Ppar α) が RJ 投与 KK-Ay マウスの体重減少に関連していることを示唆した。

方 法

1. 実験動物

実験には7週齢の肥満性糖尿病マウスであるKK-Ay（日本クレア）を購入して用いた。なお実験には全て雌マウスが使われた。全てのマウスはSpecific Pathogen Free（SPF）環境下で、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12時間昼夜サイクル（7時点灯、19時消灯）にて飼育し、 γ 線滅菌飼料および飲料水は自由摂取とした。マウスはローヤルゼリー（RJ or RJ10）投与群およびコントロールとして $1 \times \text{PBS}$ ($1/15 \text{ mol/L}$)（PB）を投与する群、それぞれ8匹ずつの2グループを作った。また週に1度体重と1週間の摂餌量の測定をした。本実験は京都産業大学動物実験委員会のガイドラインに従って動物実験を実施した。

2. RJの投与

日本産RJは $1 \times \text{PBS}$ で1000倍希釈し、ローヤルゼリー溶液を作り、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルター（ミリポア）で除菌濾過した。この溶液を1日1回（5日/週）経口ゾンデを用いて強制経口投与した。投与量は 10 mg/kg になるように調整した。また、RJ投与群以外にはコントロールとして $1 \times \text{PBS}$ ($1/15 \text{ mol/L}$) を経口投与した。投与はマウスが8週齢になった時点から5週間行った。

3. 経口糖負荷試験（Oral Glucose Tolerance Test: OGTT）

RJ投与開始から1週間後、並びに5週間後にOGTTを行った。一晩の絶食後、空腹時血液をマウス尾部より採血してグルテストNeoセンサー（三和科学）により空腹時血糖値を測定した¹³⁾。これをOGTT、0分値とした。測定後、50%グルコース液（大塚製薬）を 2 g/kg 、経口的に投与した。投与後、30分おきに120分まで尾部より採血し血糖値を測定した。また、0分から120分までの総血糖値（glucose Area Under the Curve: AUC）は所定の台形式により計算した。

なお、5週間後に行ったOGTTでは血中インスリン濃度測定のため0、15、30分値でヘマトクリット管1本分を尾部より採血した。

4. 腹腔インスリン負荷試験（Intraperitoneal Insulin Tolerance Test: ipITT）

投与開始から4週目にITTを行った。一晩の絶食後、空腹時血液をマウス尾部より採血してグルテストNeoセンサー（三和科学）により空腹時血糖値を測定した。これをITT、0分値とした。測定後、インスリン（日本イーライリリー社）を 0.5 U/kg 、腹腔投与した¹⁴⁾。投与後、30分おきに120分まで尾部より採血し血糖値を測定した。

5. 血清および臓器の採取

投与開始から5週目に血清および臓器の採取を行った。10倍希釈したソムノペンチルを50 mg/kg 静脈内投与し、麻酔後、後大静脈より全採血し安楽死させた。麻酔の効きが悪い場合はイソフルランを吸わせ追加麻酔をした。

マウスの後大静脈より採取した血液は60分程静置後、12000 rpm 5分 24°C で遠心し、採れた血清を-80°C で保存した。その後、肝臓、後腹膜脂肪、腸間膜脂肪、骨格筋を採取し、肝臓、腹腔の各脂肪についてはそれぞれ重量を測定した。また、肝臓、骨格筋から約0.5 gを採取し、ジルコニアビーズ 5.0 φ (TOMY: ZB-50) 入りの Isogen II (日本ジーン社) 溶液 1.0 ml に入れ、Bead Smash 12 細胞破碎機 (和研薬) にて 4000 rpm 10 秒ホモジナイズ後、-80°C で保存した。ただし、骨格筋のみ 40 秒間ホモジナイズした。

また、タンパク実験用として 2.0 ml チューブに採取した臓器を入れ、そのまま -80°C で保存した。Nishiumi & Ashida¹⁵⁾ に記載されているように、KK-Ay マウスの骨格筋から膜画分を調製した。

6. 血清の生化学的検査

血中の遊離脂肪酸 (NEFA)、総コレステロール (TCHO)、中性脂肪 (TG) は、比色法を用いて、NEFA-C テスト (Wako)、コレステロール E テスト (Wako)、トリグリセライド E テスト (Wako) を用いて測定した。遊離脂肪酸は試料と2種類の発色試薬を順番に入れ、各 37°C で 10 分間インキュベートした後、分光光度計を用いて吸光度 (557 nm) を測定した。総コレステロール、中性脂肪は試料と発色試薬を混合し、37°C で 5 分間インキュベートした後、分光光度計で吸光度 (600 nm) を測定した。それぞれ標準液と吸光度の値から検量線を作製し、サンプル濃度を算出した。

7. インスリン測定

血中インスリン濃度はレビスインスリンマウス T-ELISA キット (SIBAYAGI) を用いて測定した。ELISA 用のウェルプレート、試薬類を十分に室温 (20 ~ 25°C) に戻した (2 時間以上)。その後、濃縮洗浄液の希釈として室温化した蒸留水で 10 倍希釈した。次に、標準溶液の希釈を室温化した緩衝液で 2 倍の段階希釈をした。これは 8 連チューブを用い、1 本目に緩衝液 190 μl、残りの 7 本には 100 μl ずつ入れ、標準溶液を 1 本目に 10 μl 入れ、よくピペティングしてそこから 100 μl とり、次のチューブに移すことを繰り返して行った。ただし、最後のチューブには標準溶液は入れず緩衝液のみとした。

次に、室温化した緩衝液でビオチン結合抗インスリン抗体を 4000 倍希釈した。なお 4000 倍希釈の際、2 段階希釈を行ったため、1 段階目で 40 倍希釈し、2 段階目でそれをさらに 100 倍希釈し、4000 倍希釈液を作製した。そして、凍結しておいた血清を氷上で融解し、緩衝液で

30 倍希釈し、サンプルを調整した。その後、抗体固相化 96 ウェルプレート在先程の希釈した洗浄液で 4 回洗浄した。洗浄後 100 μ l のビオチン結合抗インスリン抗体を抗体固相化 96 ウェルプレートに撒いた。次に、標準インスリン溶液と調節しておいたサンプルを 10 μ l ずつ入れて、攪拌後、室温 (20 ~ 25°C)、2 時間静置して反応させた。

2 時間の反応の終わる 30 分前に、室温化した緩衝液でペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 2000 倍希釈した。なお、2000 倍希釈の際、1 段階目で 20 倍希釈し、2 段階目でそれをさらに 100 倍希釈し、2000 倍希釈液を作製した。

2 時間の反応後、抗体固相化 96 ウェルプレートを 4 回洗浄し、希釈しておいたペルオキシダーゼ・アビジン結合物を 100 μ l ずつ撒き、攪拌後、室温 (20 ~ 25°C) で 30 分間静置して反応させた。30 分後、抗体固相化 96 ウェルプレートを 4 回洗浄し、発色液 (TMB) を 100 μ l ずつ撒き、攪拌後、室温 (20 ~ 25°C) で 30 分間静置して反応させた。30 分後、洗浄せずに反応停止液 (1 M H_2SO_4) を 100 μ l 加え、攪拌した。その後、吸光度測定 (主波長 450 nm、副波長 620 nm : 600 ~ 650 nm) を行った。

8. Total RNA 抽出と濃度測定

Isogen II 溶液内の各凍結臓器 (肝臓、副睾丸脂肪、骨格筋) を融解し、そこに 0.4 ml の滅菌蒸留水を入れた後、15 秒間激しく振り、室温で 15 分間静置した。その後、12000 rpm 15 分 4°C で遠心した。遠心後、上清を 1.0 ml とり、5 μ l の p-Bromoanisole を入れ、15 秒間振り、室温で 5 分間静置した。その後 12000 rpm 10 分 4°C で遠心した。遠心後、上清を 0.9 ml とり、75% エタノールを 0.4 ml 入れ、転倒混和した後、室温で 10 分間静置した。その後 12000 rpm 8 分 4°C で遠心した。遠心後、サンプルをデカントし、75% エタノールを 0.5 ml 入れ、8000 rpm 3 分 4°C で遠心した。遠心後、再びサンプルをデカントし、75% エタノールを 0.5 ml 入れ、8000 rpm 3 分 4°C で遠心した。その後、サンプルをデカントし、沈殿を 5 分間風乾させた。風乾後、RNase free water (DEPC treated water) を 0.1 ml ずつ入れ、10 分間冷蔵庫で静置した。10 分後、それぞれの RNA 濃度を測定した。

9. ホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動

抽出した Total RNA がインタクトであることを確認するために、変性ゲルを用いた電気泳動を行った。100 ml のビーカーに蒸留水 36 ml とアガロース S (日本ジーン社) を 0.75 g 入れ、攪拌した (2 枚分)。その後、電子レンジ 200 W で加熱し溶解させ、65°C まで冷ました。温度が下がったら、ドラフト内で 10 \times MOPS buffer を 5.0 ml とホルムアルデヒド 9.0 ml を攪拌しながら加えた。その後、ゲルトレイに流し込み、30 分から 40 分間静置しゲルを作製した。ゲルができた後、ゲルと 1 \times MOPS buffer を泳動槽に入れ 50 V で 15 分間のプレ泳動を行った。

RNA サンプル調整液の作製として RNA 一サンプルにつき、10 \times MOPS buffer 2.0 μ l、ホ

ルムアルデヒド 4.0 μ l、ホルムアミド 10.0 μ l、0.2 mg/ml エチジウムブロマイド (50 倍希釈) 2.0 μ l の計 18 μ l の試薬調整を行った。作製した RNA 調整液に、濃度を 500 ng/ μ l に調整した RNA を 8 μ l 入れ、65°C で 15 分間熱変性させた。変性後、BTB 1.0 μ l とローディングバッファー 1.0 μ l をそれぞれ入れ、プレ泳動後のゲルに 10 μ l ずつ入れた。そして、50 V で 60 分間泳動し、60 分後 UV トランスイルミネーターを用いて、バンドパターンを確認した。

10. RT-PCR

抽出した Total RNA を cDNA とするため、PrimeScript RT reagent Kit [Perfect Real Time] (TAKARA BIO 社) を用いて逆転写 PCR を行った。試料と 4 種類の試料をプロトコールに従い順番に混ぜ、PCR (37°C 15 分、85°C 5 秒) を行った。なお逆転写の際の使用 RNA は 500 ng/ μ l になるように調整した。

11. quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

マウスの各組織での遺伝子発現量をみるために、定量 PCR である qRT-PCR を行った。蛍光色素として SYBR green を使用し、SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA BIO 社) を用いた。qRT-PCR には、Step One Plus (Applied Biosystems 社) を用い、反応条件は 95°C 30 秒 1 cycle、95°C 5 秒、60°C 30 秒 40 cycle で検量線法にて行った。相対比較のためのハウスキーピング遺伝子は Gapdh (TAKARA BIO 社) を使用し、プライマー毎の PCR 産物の増幅速度から得られる値を Gapdh の値で割ることによって標準化し、相対的な鋳型 mRNA 量を計算した。

12. Western blot

マウスの各組織でのタンパク発現量をみるために Towbin et al.¹⁶⁾ を少し改変した Western blot を行った。サンプル調整液として、臓器抽出液を 14000 rpm 10 分 4°C で遠心して得た上清を滅菌蒸留水で希釈し、2 \times Laemmli sample Buffer (Bio-Rad) を等量加え、95°C で 3 分間インキュベートし、サンプル調整液を作製した。なお、Phospho-FoxO1 および FoxO1 は Dynabeads ProteinG (10003D, life, technologies, Tokyo, Japan) を用いて immunoprecipitation を行った。

サンプル調整液を 12% SDS-Polyacrylamide Gel にアプライし、15% SDS-PAGE で電気泳動し、ゲルに分離したタンパクを PVDF 膜 (Immobilon[®]-P: ミリポア) に転写するために電気泳動した。その後、nonfat dry milk と 0.1% Tween 20 TBS で 5% のミルクを作製し、これによって PVDF 膜をブロッキングした。ブロッキング後、PVDF 膜を洗浄し、先程作製したミルクに Glut4 (1F8) (#2213, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、Anti β -Actin, Monoclonal Antibody (017-24551, Wako Pure Chemical, Ltd., Osaka, Japan)、

Phospho-AMPK α (Thr172) (D79.5E) (#4188, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan) AMPK α (D63G4) (#5832, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、Phospho-Akt (Ser473) (D9E) (#4060, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、Akt (Pan) (C67E7) (#4691, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、Phospho-FoxO1 (Ser256) (#9461, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、FoxO1 (C29H4) (#2880, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、Phospho-Glycogen Synthase (Ser641) (#3891, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、Glycogen Synthase (15B1) (#3886, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、Phospho-GSK-3 β (Ser9) (D85E12) XP (#5558, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)、GSK-3 β (3D10) (#9832, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan) に対する抗体を 2000 倍希釈し、PVDF 膜をインキュベートした。その後、PVDF 膜を洗浄し、ミルクに二次抗体 (SC-3837, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA および 474-1806, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Washington, DC, USA) を 5000 倍希釈し PVDF 膜をインキュベートした。その後、PVDF 膜を洗浄し、Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) を用いてバンドを検出した。

また、ROS はカルボニル化タンパク質ウェスタンブロット検出キット 15blots (コスモ・バイオ社) の実験プロトコルに従って Western blot を行った。

13. 統計解析

全ての結果の比較は平均値 \pm SE で示した。また、2 群間の比較は Student-t テストを用いて算出した。3 群以上の比較は ANOVA を用いた。

結 果

1. RJ が体重、腹部脂肪体重、および食物摂取量に及ぼす影響

RJ 投与 4 週間後 ($p = 0.042$) および 5 週間後 ($p = 0.039$)、RJ 投与群の体重は、コントロール群よりも有意に低くなった (図 1a)。食物摂取量は両群間で有意差は認められなかった (図 1b)。腹部脂肪体重は統計学的に有意ではなかったが、RJ 投与群でコントロール群よりも低い傾向を示した (図 1c、d)。これらの結果は、RJ が体重増加に対して抑制的に作用することを示唆している。

2. RJ は高血糖を改善する

RJ 投与 1 週間後の糖負荷試験 (OGTT) の結果を図 2a に示したように、1 週間程度では RJ の血糖値に対する影響は全く認められなかった。図 2b に RJ 投与 5 週間後の糖負荷試験の結

果を示した。血糖値は、グルコース負荷後 30 分 ($p = 0.049$)、60 分 ($p = 0.0036$) および 90 分後 ($p = 0.024$) にコントロール群 (PB 処置群) よりも RJ 投与群で有意に低くなった。さらに RJ 投与群とコントロール群との間のグルコース AUC (総血糖値) にも有意差が認められた ($p = 0.027$; 図 3c)。これらの結果は、RJ 投与が KK-Ay マウスにおける耐糖能異常を改善することを明確に示している。

3. RJ はインスリン抵抗性を改善しない

我々は、KK-Ay マウスにおける RJ 投与がインスリン抵抗性を改善するかどうかを決定するために RJ 投与 4 週後にインスリンを腹腔内注射し血糖値の降下程度からインスリン抵抗性を調べる ITT を行った。図 3a に示すようにグルコース低下効果は、RJ 投与群とコントロール群 (PB 群) とでほぼ同一であり、RJ によるインスリン抵抗性改善効果は認められなかった。血漿インスリンレベルは RJ 投与 5 週間後の OGTT の際に採血して測定したが、RJ 投与とコントロール群とで有意差はなく (図 3b)、RJ 投与がインスリン感受性を改善していないことを示唆する結果であった。次いで、空腹時の血糖値とインスリン値から HOMA-IR (図 3c) 並びに HOMA-IR (図 3d) をコントロールと RJ 投与群とで比較したがいずれも有意差は無く、インスリン抵抗性は改善されていない結果を得た。これらの結果は RJ がインスリン感受性およびインスリン抵抗性に影響を与えないことを示している。

4. 代謝アッセイ

血清中の遊離脂肪酸 (NEFA) 値は、コントロール群よりも RJ 投与群 ($p = 0.047$) において有意に低かった (図 4a)。他方、血清コレステロール (TCHO) 値および中性脂肪 (TG) 値には差がなかった (図 4b, c)。遊離脂肪酸は糖尿病状態で増加するが RJ 投与により有意に抑制がかかっていると示唆される結果であった。インスリンはホルモン感受性リパーゼ発現を抑え、遊離脂肪酸を減少させると考えられている。通常であれば今回の RJ 投与群の NEFA レベル低下は、RJ がインスリン感受性を増大させることによる HSL 抑制が生じ、結果として NEFA レベルが減少すると考えられるところであるが、実際は、本研究では RJ はインスリン感受性および抵抗性に影響を与えなかった (図 3a-d)。そのことから推定して、RJ は直接 HSL に抑制的に作用した可能性がある。そのことを確認するために Hsl mRNA レベルを測定した。肝臓および脂肪における相対的な Hsl mRNA 発現レベルは、群間で有意に異ならなかった (図 4e, f)、骨格筋におけるその発現はコントロール群より RJ 投与群で有意に低かった ($p = 0.048$; 図 4d)。RJ 投与は、骨格筋における Hsl 発現を直接抑制させる可能性がある。

5. AdipoQ および AdipoR1 mRNA 発現に対する RJ の効果

RJ 投与により肥満の改善が認められたことから、肥満に関連するアディポネクチン (AdipoQ) 関連を精査した。血清 AdipoQ レベルでは、RJ 投与とコントロール群 (図 5a) とで有意差はなかった。しかし Adiponectin は脂肪組織で作られることから脂肪組織における AdipoQ mRNA の発現を調べたところ、RJ 投与群において有意に発現が高く ($p = 0.043$)、adiponectin (AdipoQ) の産生が改善していることを示唆した (図 5b)。AdipoQ の発現増加は Adiponectin receptor の発現を促すことから、それらの mRNA 発現を調べた。その結果、AdipoR2 は肝臓、脂肪、骨格筋においては RJ 投与群とコントロール群とで有意差はなかった (data not shown) が、AdipoR1 は肝臓において RJ 投与群において有意に高く発現していた ($p = 0.000087$; 図 5c)。一方、脂肪組織、骨格筋においては有意差は認められなかった (図 5d、e)。即ち、AdipoR1 の発現亢進は肝臓特異的な現象であるといえる。

6. 糖新生遺伝子発現の抑制

AdipoQ は、AMPK を活性化することによって糖新生に関与する遺伝子を抑制すると報告されている¹⁷⁾。ウェスタンブロッティングを用いて Thr-172 (pAMPK) での AMPK リン酸化を測定したところ、pAMPK の発現レベルは、コントロール群よりも RJ 投与群で肝臓で有意に高かった ($p = 0.0035$; 図 6a)。pAMPK 発現の増加による糖新生に関与するキー遺伝子の発現の寄与を検討するために、我々はそれらの遺伝子の qRT-PCR を行った。G6Pase の mRNA 発現レベルは、コントロール群よりも RJ 投与群の肝臓において有意に低かった ($p = 0.028$; 図 6b)。しかしながら、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (Pck-1) mRNA レベルは、群間で有意差は認められなかった (図 6c)。これらの結果は、RJ 投与により、AMPK 活性化を通して KK-Ay マウスにおいて選択的にグルコース放出直前に関与する酵素である G6Pase 発現を抑制し、糖の放出を押さえていることを示唆している。

さらに、pAMPK 発現レベルは、コントロール群よりも RJ 投与群の筋肉においても有意に高かった ($p = 0.0076$; 図 6d)。しかし、筋肉細胞膜表面への Glut4 転座は両グループ間で有意差はなかった (図 6e)。筋肉における AMPK 活性化が常に Glut4 転座の増加をもたらすとは限らないことを示唆している。したがって、RJ を用いた高血糖の改善は、グルコース産生のゲートキーパーとしての G6Pase 発現の抑制に起因し、AMPK 活性化による筋肉へのグルコースの取り込みの増強によるものではないと思われる。

7. Ppara、Tnf- α および活性酸素 (ROS) の発現

Ppara は、脂質代謝および脂肪生成に関与する遺伝子の発現を制御するため、RT-qPCR を用いてこれらの遺伝子の発現を比較した。脂肪酸酸化経路の主要な活性化因子である肝臓の炎症に対する抵抗性を示す酵素、Ppara の mRNA 発現レベルは、コントロール群より肝臓で有

意に高かった ($p = 0.0021$; 図 7a)。即ち Ppara の活性化が脂肪分解を促進し、RJ 投与後の体重増加の抑制に寄与することを示唆している。腫瘍壊死因子 Tnf- α はインスリンの効果を減弱させるが、RJ 投与によりその mRNA 発現レベルは、コントロール群よりも RJ 投与群の脂肪で有意に低く押さえられた ($p = 0.0099$; 図 7b)。

活性酸素種 (ROS) 生成の抑制:

Pgc-1 α は、ROS 産生を抑制すると報告されている¹⁸⁾。実際、Pgc-1 α は肝臓において増大していた (data not shown)。したがって、我々はウェスタンブロッティングによってカルボニル化タンパク質レベルを測定することにより ROS の発現を調べた。RJ 投与群の肝臓では、コントロール群よりも ROS レベルが有意に低く ($p = 0.023$; 図 7c)、肝臓の代謝が酸化ストレスの減少によって改善されることが示唆された。

考 察

RJ 投与は、2 型糖尿病の女性の平均血清グリコシル化ヘモグロビンおよび空腹時血糖値を有意に低下させる⁹⁾ことから、RJ 投与が糖尿病を改善することを示唆している。しかしながら、関与する分子機構は不明である。本研究において、肥満 / 糖尿病 KK-Ay マウスにおいて、RJ 投与が食後の高血糖および体重を部分的に減少させることを示した。肥満関連遺伝子である、AdipoQ mRNA 発現レベルが、腹部脂肪におけるコントロール群のものと比較して、RJ 投与群で有意に増加したことを見出した。さらに、我々は、AdipoR1 発現が、コントロール群よりも RJ 投与群の肝臓において有意に高かったことを見出した。さらに、AdipoQ または AdipoR1 の高発現が AMPK リン酸化を促進するため、AMPK 発現レベルを調べた^{19,20)}。我々の結果は、リン酸化された AMPK の発現レベルが、RJ 投与群の肝臓および筋肉で増強されたことを示した。これは、AdipoQ および AdipoR1 mRNA 発現の増強が AMPK 活性化に寄与していることを示唆している。さらに、他の報告では、AdipoQ が肝臓および筋肉における AMPK リン酸化を直接刺激することが明らかになっている^{17,19,21)}。

AMPK アップレギュレーションは、グルコース新生によるグルコース産生の最終段階において重要な酵素である G6Pase の mRNA 発現を抑制することを報告している²²⁾。本研究において、RJ 投与群において G6Pase の mRNA 発現が抑制されることを明らかにした。したがって、以下のように、RJ 投与による高血糖を改善するメカニズムを説明することができるであろう。RJ 投与は AdipoQ mRNA 発現を増強し、AdipoR1 mRNA 発現を増加させる。AdipoQ および AdipoR1 の両方が肝臓および筋肉における AMPK リン酸化を刺激し、活性化された AMPK は G6Pase 発現レベルを抑制する。RJ 投与によって引き起こされるより高い AdipoQ 発現は、Miller et al. が報告しているように²³⁾、直接マウス肝細胞における糖新生遺伝子発現

の抑制をもたらしている可能性も否定出来ない。

RJ 投与は糖尿病女性の平均体重を有意に減少させ⁸⁾、ヒトにおけるリポタンパク質代謝を改善した²⁴⁾。Tsuchida et al. は Ppar α 活性化が KK-Ay マウスにおける脂肪細胞肥大を部分的に防止することを報告している²⁵⁾。Ppar α 発現は、高脂肪誘導非アルコール性脂肪肝からマウスを保護する²⁶⁾。図 7a に示すように、肝臓における Ppar α mRNA 発現は、KK-Ay マウスのコントロール群よりも RJ 投与群で有意に高かった。従って Ppar α 発現の増強が RJ 投与群で観察された体重減少に寄与した可能性のあることを示唆している。肥満マウス (ob/ob) で HSL を欠損させると肥満が抑えられること²⁷⁾、脂肪生成を改善抑制し、血漿グルコースレベルを改善する²⁸⁾ ことから、RJ 投与群の筋肉における HSL レベルの低下 (図 4d) は体重減少につながった可能性がある。Ppar α は肥満誘発肝炎²⁹⁾ を保護するため、RJ 投与群における Ppar α mRNA 発現の上昇は、部分的に炎症印紙である Tnf- α mRNA 発現の低下に寄与している可能性がある (図 7b)。

Pgc-1 α は、ROS 産生を抑制し、いくつかの重要な ROS 解毒酵素の誘導によって引き起こされる酸化ストレス誘発死から神経細胞を保護する^{18,30)}。我々は、Pgc-1 α mRNA 発現が、RJ 投与群において高かった (data not shown) が、ROS 産生は、コントロール群よりもこの群で低かったことを明らかにした (図 7c)。これらの結果は、RJ 投与が Pgc-1 α mRNA 発現を増強することにより酸化ストレスを改善し、それによって ROS 産生を減少させることを示唆している。最近の研究は、生理学的刺激に応答する ROS 産生がインスリン感受性を促進し、インスリン抵抗性を減弱させることを示した^{31,32)}。しかし、RJ 投与による ROS 産生の減少は、KK-Ay マウスにおけるインスリン感受性および耐性に影響しないようであった (data not shown)。

結論として、我々の研究は、RJ 投与が肥満 / 糖尿病 KK-Ay マウスにおいて高血糖を改善し、体重を減少させることを見出した。我々は、RJ 投与が AdipoQ および AdipoR1 発現を活性化し、その結果として AMPK が活性化され、肝臓におけるグルコース産生の最終的なゲートキーパーである G6Pase 発現が抑制されるメカニズムを提案する。さらに、RJ 投与における AdipoR1 発現の増強は、脂質利用を改善した Ppar α および Pgc-1 α の発現を促進し、KK-Ay マウスの体重を減少させると推定される。

引用文献

- 1) Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001 Dec 13;414:782-7.
- 2) Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404:635-43.
- 3) Okauchi N, Mizuno A, Zhu M, Ishida K, Sano T, Noma Y, Shima K. Effects of obesity and inheritance on the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima

- fatty rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 1995 Jul;29:1–10.
- 4) Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006 Dec 14;444:840–6.
 - 5) Kahn SE. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86:4047–58.
 - 6) Okauchi N, Mizuno A, Yoshimoto S, Zhu M, Sano T, Shima K. Is caloric restriction effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka Long Evans Tokushima fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus? *Diabetes Res Clin Pract.* 1995 Feb;27:97–106.
 - 7) Shima K, Shi K, Sano T, Iwami T, Mizuno A, Noma Y. Is exercise training effective in preventing diabetes mellitus in the Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus? *Metabolism.* 1993 Aug;42:971–7.
 - 8) Pourmoradian S, Mahdavi R, Mobasser M, Faramarzi E, Mobasser M. Effects of royal jelly supplementation on body weight and dietary intake in type 2 diabetic females. *Health Promot Perspect.* 2012;2:231–5.
 - 9) Pourmoradian S, Mahdavi R, Mobasser M, Faramarzi E, Mobasser M. Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. *Chin J Integr Med.* 2014 May;20:347–52.
 - 10) Shidfar F, Jazayeri S, Mousavi SN, Malek M, Hosseini AF, Khoshpey B. Does Supplementation with Royal Jelly Improve Oxidative Stress and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients? *Iran J Public Health.* 2015 Jun;44:797–803.
 - 11) Zamami Y, Takatori S, Goda M, Koyama T, Iwatani Y, Jin X, Takai-Doi S, Kawasaki H. Royal jelly ameliorates insulin resistance in fructose-drinking rats. *Biol Pharm Bull.* 2008 Nov;31:2103–7.
 - 12) Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, et al. Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet.* 2008 May;40:516–22.
 - 13) Sasaki D, Kotoh J, Watadani R, Matsumoto K. New animal models reveal that coenzyme Q2 (Coq2) and placenta-specific 8 (Plac8) are candidate genes for the onset of type 2 diabetes associated with obesity in rats. *Mamm Genome.* 2015 Aug 22;26:619–29.
 - 14) Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Nojima K, Babaya N, Yamada K, Shibata M, Yamato E, Ogihara T. Age-dependent changes in phenotypes and candidate gene analysis in a polygenic animal model of Type II diabetes mellitus; NSY mouse. *Diabetologia.* 2000 Jul;43:932–8.
 - 15) Nishiumi S, Ashida H. Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 Sep;71:2343–6.
 - 16) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76:4350–4.
 - 17) Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes.* 2003 Jun;52:1355–63.
 - 18) St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coacti-

- vators. *Cell*. 2006 Oct 20;127:397–408.
- 19) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002 Nov;8:1288–95.
 - 20) Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*. 2007 Mar;13:332–9.
 - 21) Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005 May;26:439–51.
 - 22) Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F, Foretz M. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2009 May;196:81–98.
 - 23) Miller RA, Chu Q, Le Lay J, Scherer PE, Ahima RS, Kaestner KH, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121:2518–28.
 - 24) Guo H, Saiga A, Sato M, Miyazawa I, Shibata M, Takahata Y, Morimatsu F. Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2007 Aug;53:345–8.
 - 25) Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes*. 2005 Dec;54:3358–70.
 - 26) Abdelmegeed MA, Yoo SH, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ, Song BJ. PPARalpha expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. *J Nutr*. 2011 Apr 1;141:603–10.
 - 27) Sekiya M, Osuga J, Okazaki H, Yahagi N, Harada K, Shen WJ, Tamura Y, Tomita S, Iizuka Y, et al. Absence of hormone-sensitive lipase inhibits obesity and adipogenesis in *Lep ob/ob* mice. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279:15084–90.
 - 28) Claus TH, Lowe DB, Liang Y, Salhanick AI, Lubeski CK, Yang L, Lemoine L, Zhu J, Clairmont KB. Specific inhibition of hormone-sensitive lipase improves lipid profile while reducing plasma glucose. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Dec;315:1396–402.
 - 29) Stienstra R, Mandard S, Patsouris D, Maass C, Kersten S, Muller M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology*. 2007 Jun;148:2753–63.
 - 30) Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y. Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One*. 2010;5:e11707.
 - 31) Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin B, Galic S, Bruce C, Shields BJ, Skiba B, et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell metabolism*. 2009 Oct;10:260–72.
 - 32) Tiganis T. Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Feb;32:82–9.

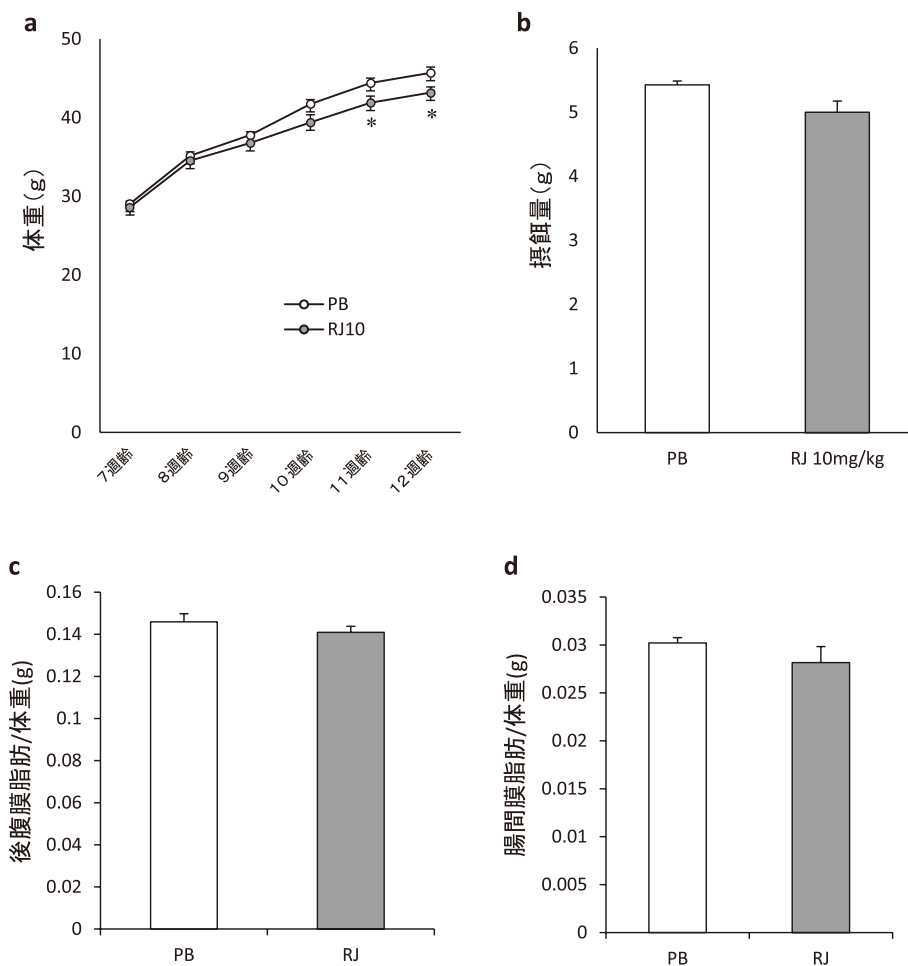


図 1 KK-Ay マウスの体重、食物摂取量および脂肪組織重量に対する RJ の長期投与の影響。RJ の投与は、8 週齢で開始した。a: 10 mg/kg の RJ をリン酸緩衝液に溶かしたもの (RJ or RJ10) とリン酸緩衝液単独 (PB: コントロール) で 4 週間経口投与した KK-Ay マウスの体重を測定した (n = 8)。b: マウスの食物摂取量を 11 週齢 (n = 8) で測定した。c: 一晩絶食させたマウスを投与終了後 2 日目に犠牲にし、後腹膜脂肪および、d: 腸間膜脂肪を測定した (n = 8)。データは平均 ± SEM として示す。* p < 0.05 vs. PB (コントロール)。

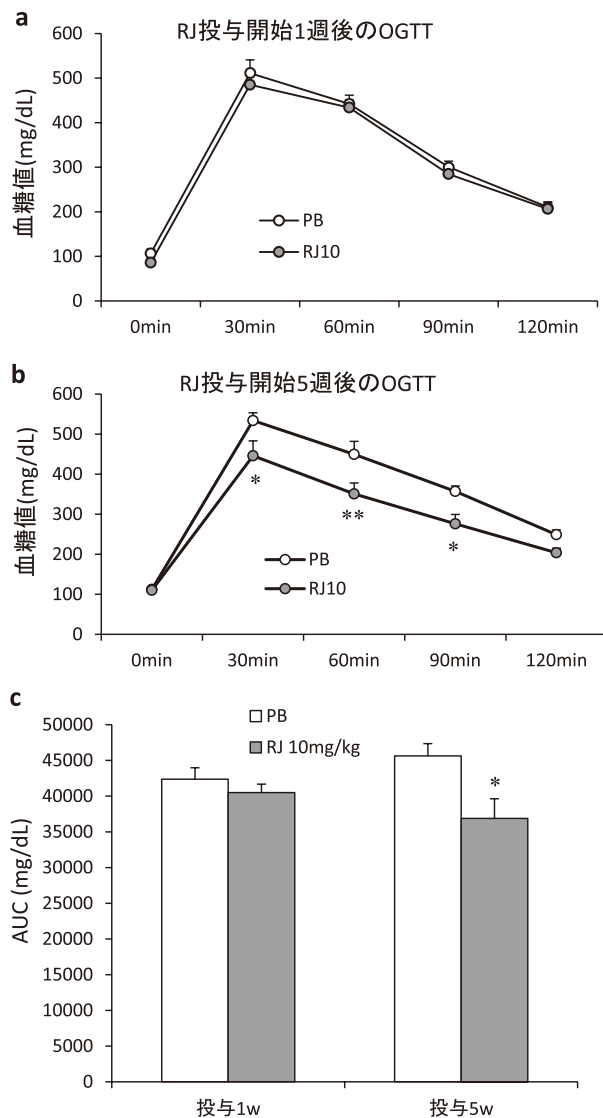


図2 KK-Ay マウスにおける血中グルコースレベル。10 mg/kg RJ (n = 8) または PB (コントロール) (n = 8) 投与、a : 1 週間投与後および、b : 4 週間投与後の血糖値を、一晩絶食させた KK-Ay マウスへの経口グルコース負荷試験 (OGTT) にて測定した。c : すべてのサンプリング時間における OGTT の結果から、血糖値の曲線下面積 (AUC) を算出した。データは平均 ± SEM として示す。
* p < 0.05, ** p < 0.01 vs. PB。

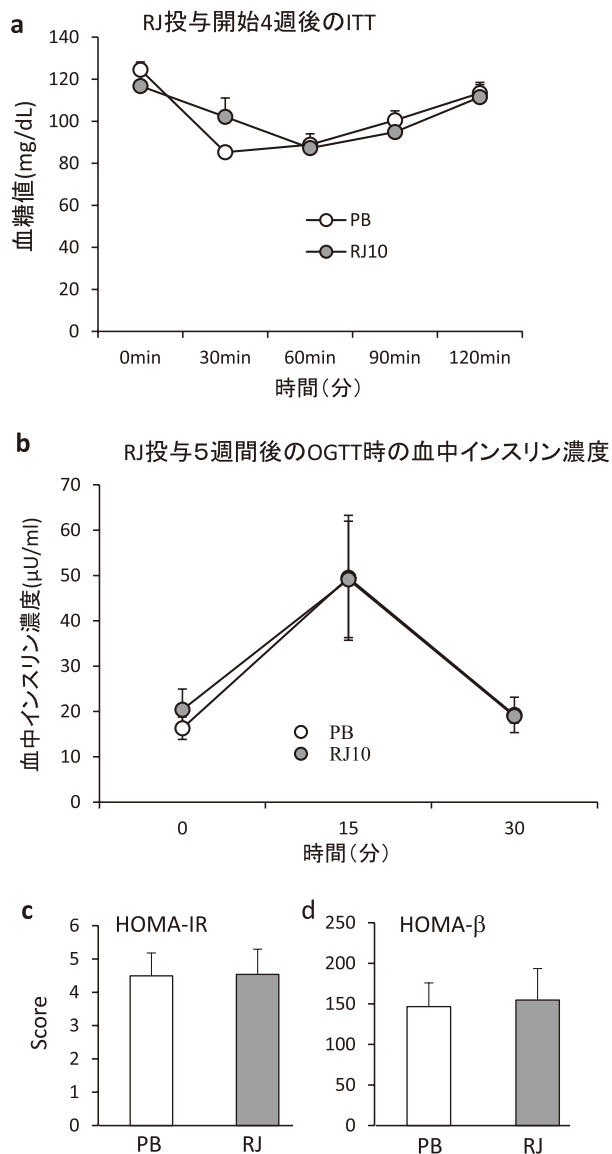


図3 RJ投与4週間後、a: インスリン抵抗性試験 (インスリンを腹腔注射し、血糖値降下作用を比較する) を行う。またRJ投与5週間後、b: OGTTの際の血中インスリン濃度を測定。RJ投与5週間後の空腹時血糖値、インスリン値からのc: HOMA-IR、d: HOMA- β を算出した。PBはコントロール群、RJはローヤルゼリー投与群。データは平均 \pm SEMとして示す。

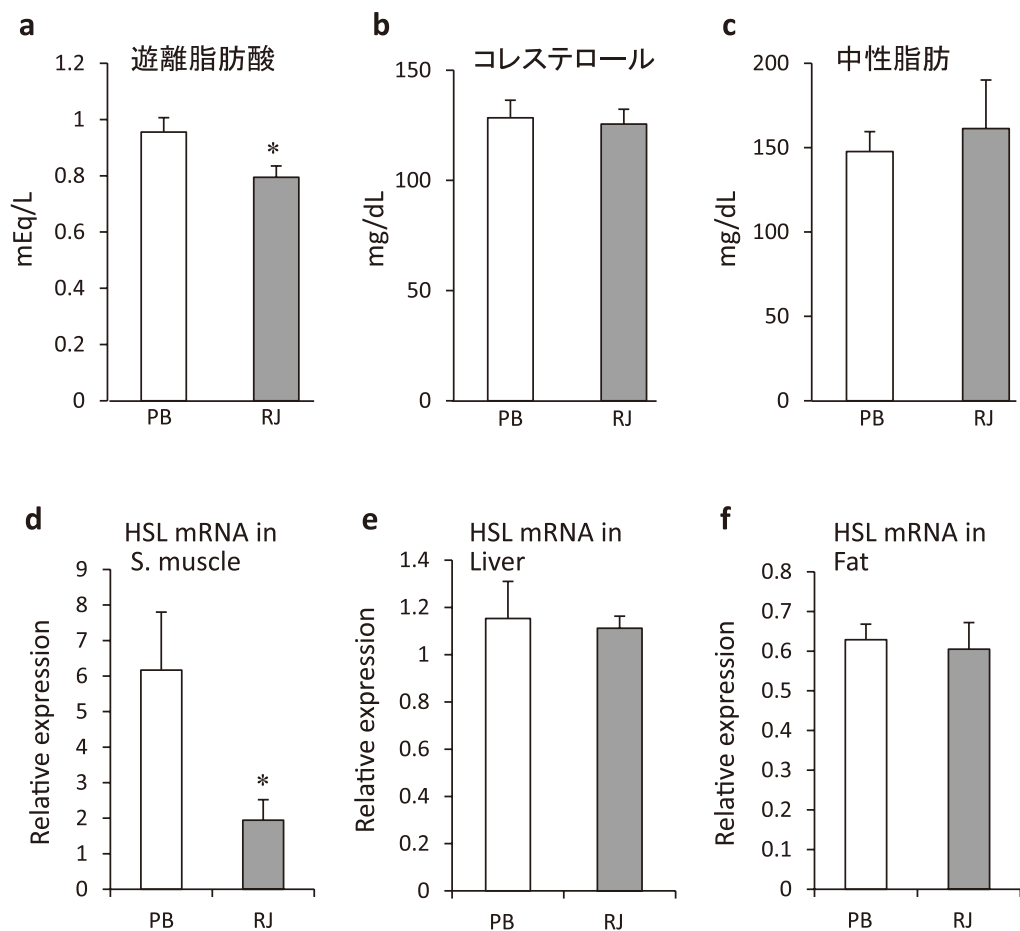


図4 KK-Ay マウスの血清遊離脂肪酸 (NEFA)、コレステロール (TCHO)、中性脂肪 (TG) レベル並びに Hs1 mRNA 発現に対する長期 RJ 投与の効果。RJ 投与期間 (n = 8) またはコントロール (n = 8) の終了2日後に一晩絶食させたマウスを犠牲にし、a: NEFAs, b: TG および、c: TCHO の血清レベルを測定した。d-f: 骨格筋、肝臓、および脂肪由来の RNA を抽出し、RJ 投与 (n = 8) およびコントロール群 (n = 8) 間の Hs1 mRNA 発現レベルを測定した。PB はコントロール群、RJ はローヤルゼリー投与群。データは平均 ± SEM として示す。* p < 0.05 vs. PB。

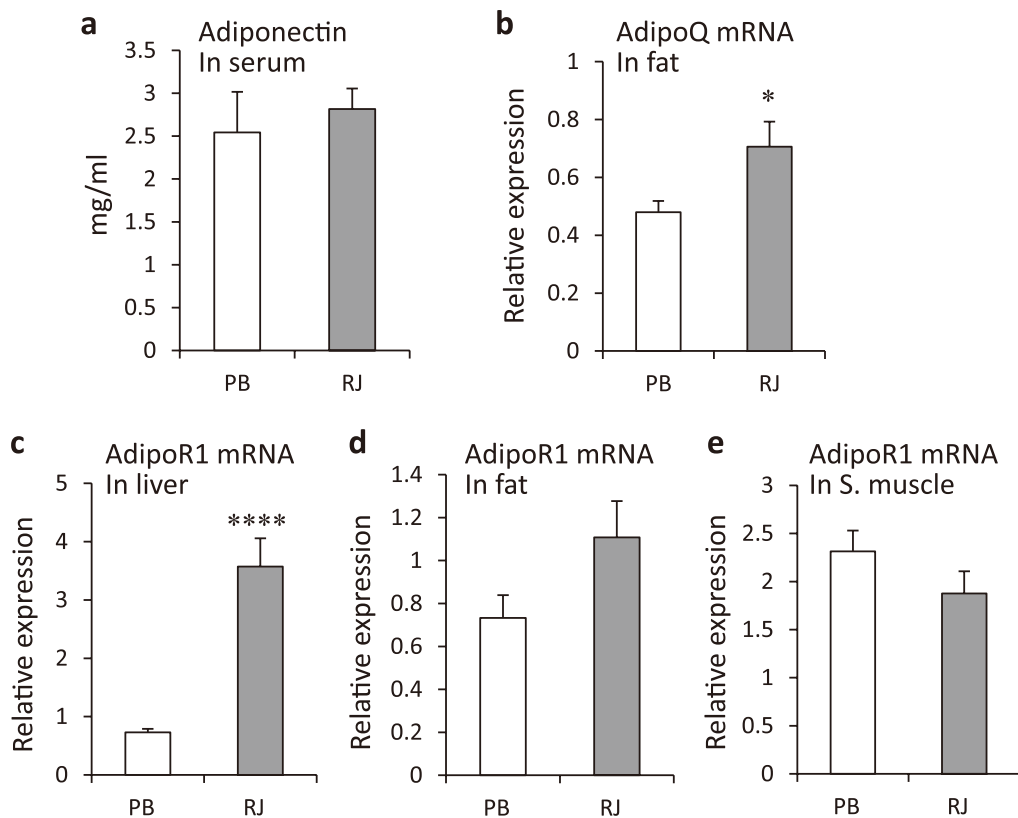


図5 KK-Ay マウスにおける、RJ 投与群とコントロール群 (PB) の投与5週間後の、a: 血清アディポネクチン、b: 脂肪組織におけるアディポネクチン mRNA 発現量、c: 肝臓における AdipoR1 の発現量、d: 脂肪組織における AdipoR1 mRNA および、e: 骨格筋における AdipoR1 mRNA の発現量。データは平均±SEM として示す。* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ vs. PB。

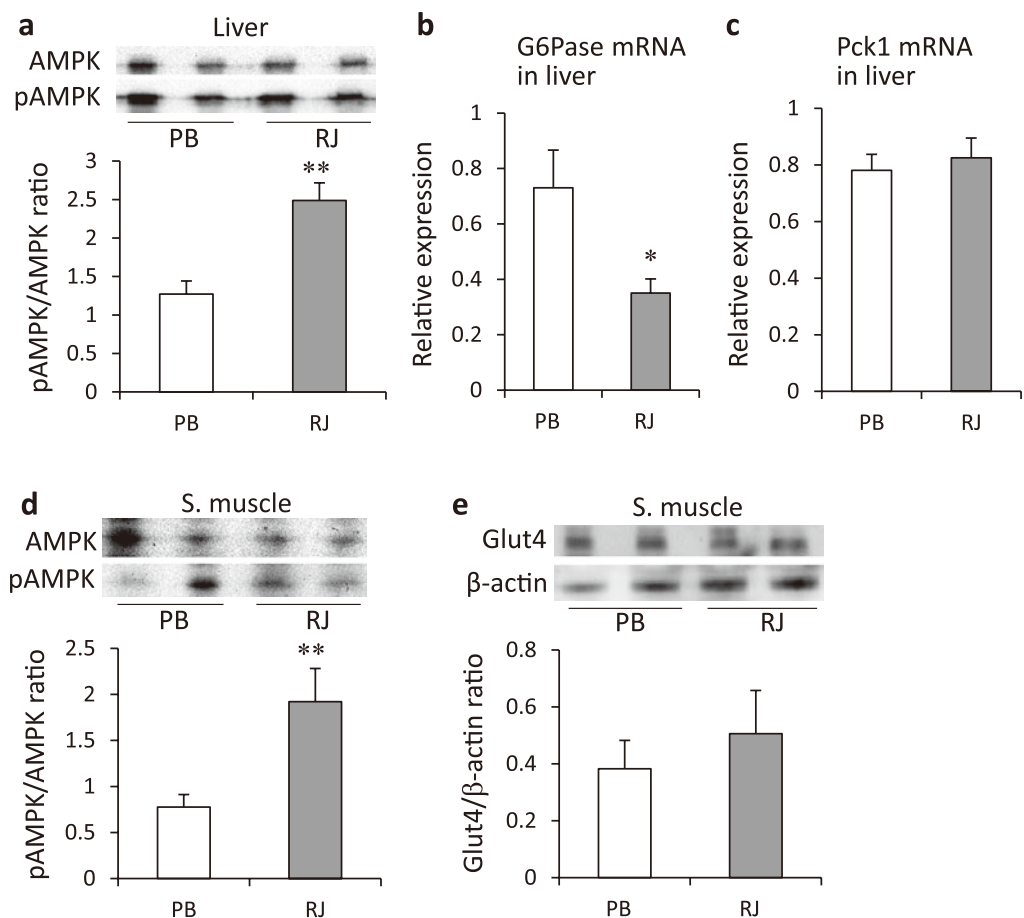


図6 RJ投与KK-Ayマウス肝臓におけるpAMPKの発現増大に伴うG6Pase mRNA発現抑制効果。筋肉におけるpAMPK発現増大に関わらずGlut4発現は増大せず。一晩絶食させたマウスを、RJ投与期間（ $n = 6$ ）またはPB（コントロール）（ $n = 6$ ）投与の終了の2日後に測定した。a：肝臓中の相対的なpAMPKレベルをウエスタンブロッティングによって決定した。b：肝臓におけるG6Pアーゼ（ $n = 8$ ）および、c：Pck1（ $n = 8$ ）の相対的なmRNA発現レベルをqRT-PCRによって定量化した。d：骨格筋（粗抽出物の上清）（ $n = 6$ ）における相対的なpAMPKレベルをウエスタンブロッティングによって決定した。e：骨格筋から精製した細胞膜画分（ $n = 6$ ）の相対的Glut4レベルをウエスタンブロッティングによって決定した。データは平均 \pm SEMとして示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. PB。

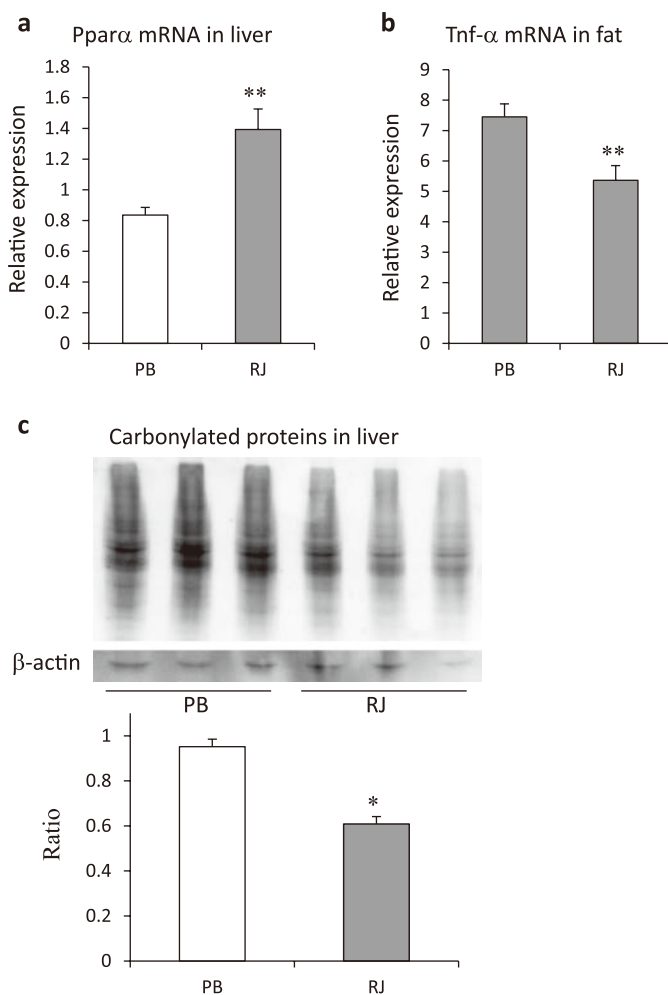


図7 長期RJ投与のPpara、Tnf- α 、ROSへの発現への影響。RJの投与終了後、2日後の解析結果である。a：Ppara mRNAの発現。b：Tnf- α mRNAの発現。c：ROSの発現レベル。PBはコントロール群、RJはローヤルゼリー投与群。データは平均 \pm SEMとして示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. PB。

Effect on body weight and plasma glucose levels by administration of Japanese royal jelly in KK-Ay mice with obesity/diabetes

Meo YOSHIDA
Kaori HAYASHI
Risa WATADANI
Jun KOTOH
Daiki SASAKI
Minoru TAKEUCHI
Kozo MATSUMOTO

Abstract

This study investigated whether royal jelly (RJ) prevents obesity and can improve diabetes. KK-Ay mice with obesity/diabetes was used. RJ (10 mg/kg) was orally administered using an oral gavage. Body weight, plasma glucose and insulin levels were measured. mRNA expression levels were determined using quantitative RT-PCR, and protein expression levels were determined using Western blotting, respectively. Four weeks of RJ administration partially suppressed weight gain and improved hyperglycemia, though it did not improve insulin resistance. At the same time, RJ administration induced adiponectin (AdipoQ) expression in abdominal fat, adiponectin receptor-1 (AdipoR1) expression in the liver, and phosphorylated Amp activated protein kinase (pAMPK) that suppressed G6Pase levels in the liver of KK-Ay mice. The pAMPK level also increased in skeletal muscle, but the translocation of glucose transporter-4 (Glut4) to the cell surface did not increase in the RJ supplemented group. Improvement of hyperglycemia by chronic administration of RJ was thought to be due to suppression of gluconeogenesis in the liver via upregulating pAMPK protein expression. The main data shown here were cited from our original paper published in Yoshida, Hayashi et al., J. Vet. Med. Sci. 79, 299–307 2017.

Keywords: Royal jelly, Diabetes, Hyperglycemia, Obesity, KK-y mice