

令和元年6月10日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00855

研究課題名(和文)メタボローム解析による米タンパク質の肥満糖尿病及び腎症進行抑制機構の解明

研究課題名(英文)Suppressive mechanism of rice protein on kidney disease progression in obese diabetes by metabolome analysis

研究代表者

渡邊 令子(Watanabe, Reiko)

新潟県立大学・その他・名誉教授

研究者番号：70141348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥満2型糖尿病モデルZDFラットにおいて、米胚乳タンパク質(REP)摂取は糖尿病や糖尿病性腎症の進行と肝臓への脂質蓄積を顕著に抑制することを見出した。本研究では、その作用メカニズムを明らかにすることを目的として、尿中代謝物質プロファイルの変動について解析した。その結果、カゼイン摂取と比較してREP摂取では86代謝物質で有意な変動が見いだされ、特にカルニチン代謝、尿素サイクル、トリプトファン代謝などの代謝系を制御していることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病は生活習慣病の最たる疾病で、かつ腎疾患や高血圧症との関連が密接である。また、肥満も多くの疾患の要因になっている。特に糖尿病性腎症の重症化は医療費高騰を招き、社会的重点課題である。腎疾患の食事療法では、病態ステージによりタンパク質制限が推奨されているが、タンパク質の「質の相違」は考慮されず、低タンパク米が利用されているのが現状である。それゆえ、本研究結果は新知見を提供することになる。また、米を中心とした伝統的食生活を栄養学的に再評価することになり、医療費軽減とともに米の消費拡大につながる。

研究成果の概要(英文)：In Zucker Diabetic Fatty rats, which are an animal model of obese type 2 diabetes mellitus, we have found that rice endosperm protein (REP) has preventive effects on obese diabetes, fatty liver and diabetic nephropathy. To clarify the functional mechanism of REP, the changes of urinary metabolite profiles were determined using CE-TOFMS. Eighty six metabolites in REP group were significantly changed compared with casein. Specifically, major alterations were found in metabolites from carnitine pathway, urea cycle, and tryptophan catabolism and large change was also found in hippuric acid.

研究分野：栄養科学

キーワード：米胚乳タンパク質 肥満2型糖尿病 糖尿病性腎症 尿中代謝物質 メタボローム解析 ZDFラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

米は、わが国やアジア地域では食生活の原点ともいえる食品で、重要なエネルギー源であると同時にタンパク質供給源（肉類、魚介類に次ぎ第3位）である。かつ、わが国では自給可能な唯一の食料である。しかし、米タンパク質の栄養生理学的な意義については、これまでの研究成果が非常に限られており、一定の見解が得られていない。米タンパク質は、胚乳部分に存在する米胚乳タンパク質（rice endosperm protein: REP）と米糠に由来する米糠タンパク質（rice bran protein: RBP）ではタンパク質組成が全く異なる、そこで、特に精白米由来である REP に着目して、未知の栄養生理機能を探索する中で、非肥満型糖尿病モデルラットを用いて REP の長期摂取が糖尿病性腎症の進行を抑制して腎機能保持効果を有することを報告した¹⁾。

一方、糖尿病は世界的規模で深刻な問題である。国際糖尿病連合によれば、有病率は 8.3%（2013）で、今後も爆発的増加が予測されている。わが国でも食生活をはじめとする生活習慣の欧米化と高齢者人口の増加を背景に 2 型糖尿病患者数は急増して、40 歳以上の国民 3 人に 1 人の割合となる。糖尿病は病状が進行すれば、網膜症、腎症、神経障害という特有の慢性合併症（細小血管障害）を引き起こし、さらに高血圧、動脈硬化性疾患などを合併して予後不良となることが知られている。わが国には糖尿病患者の 42% が糖尿病性腎症を合併し、新規透析導入患者の原因疾患の第 1 位を占めている。

2 型糖尿病は、世界的には肥満や過体重が主要因である肥満型患者が多数である。そこで、米タンパク質の糖尿病性腎症への有効性を世界に向けて発信していくためには、肥満型糖尿病における有効性を検証することが必須と考え、肥満型糖尿病モデル Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットを用いて REP の有用性について検討した。その結果、糖尿病性腎症の進行抑制効果に加え、顕著な HbA1c の改善や肝臓への脂質蓄積抑制効果を確認した²⁾。その作用機序解明のために、先ず肝臓中代謝物質プロファイル調べたところ、対照のカゼイン (casein : C) に比べて、REP では解糖系と酸化系の代謝が亢進し、かつ酸化ストレス軽減による肝機能正常化への寄与が推察された。しかし、非肥満・肥満糖尿病モデルラットの両者にみられる REP による腎症進行抑制の作用機序は不明である。その作用機序の解明は患者の病態改善につながるだけでなく、医療費削減等の社会的意義の大きい課題である。

2. 研究の目的

本研究では、米タンパク質、特に REP の長期摂取がどのように糖尿病の進行や脂肪肝を抑制して腎機能を保持しているのか、脂肪肝抑制と腎症進行抑制作用の関連を明らかにするために、主にメタボローム解析により最終代謝産物である尿中代謝物質プロファイルの変動に与える影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) ZDF ラットにおける米タンパク質の飼養試験

自然発症の ZDF ラットは、ヒト成人の 2 型糖尿病およびその合併症に近い病態を発症、高血糖、高脂血症を呈し、週齢を重ねると腎臓皮髄境界部尿細管の拡張とボーマン嚢基底膜の肥厚がみられるという特徴を有し、作用メカニズム解明に最適のモデル動物であることを事前検討で確認している。

飼育試験

6 週齢雄 ZDF ラット (220-250g) と同系統・同週齢の ZDF Lean ラット (170-190g) を供試動物 (日本チャールズリバー) とした。飼料は AIN-93G に準じ、タンパク質給源として C (対照)、REP、RBP を用いて CP20% で調製し、給餌方法はペアフィーディングとして、試験期間は 10 週間とした。なお、ZDF Lean ラットには C 食を給与し、RBP は REP と比較検討のために用いた。

試験期間中の測定項目

糖尿病の進行を評価するために毎週 18 時間の絶食後の空腹時血糖値をラット尾部先端で測定した。また、糖尿病性腎症の進行評価のために、試験開始前から 2 週間毎に 2 日間代謝ケージに移し、尿を採取して尿量と尿中アルブミン濃度 (Exocell, Inc) を測定した。

試験終了後の測定項目

採血後、腎臓、肝臓、貯蔵脂肪 (腎背部および副睾丸周囲) を速やかに採取し重量測定後、腎臓の一部は RNA レーターに浸漬し、他臓器は液体窒素で凍結後、分析まで -80 で保存した。血液の評価項目としては、HbA1c、血清インスリン (森永生化学研究所) およびアディポネクチン (大塚製薬) 濃度等を測定した。肝臓は、総脂質、トリグリセドおよび総コレステロール (和光純薬) を測定した。さらに、左腎臓を用いて糖尿病性腎症の特徴的病変である腎系球体のメサンギウムマトリックスの増加程度について、腎系球体画像を用いて評価した。

(2) CE-TOF MS による ZDF ラット尿のメタボローム解析

試験最終週の C、REP、RBP の 3 群各 6 匹の尿試料を用いた。50 μ L の試料に対し、内部標準物質濃度が 1,000 μ M となるように調製した 20 μ L の水溶液および Milli-Q 水を加えて 2 倍希釈して攪拌し、限外ろ過処理を行って測定サンプルとした。CE-TOFMS により、アニオンモードとカチオンモードの測定を行った。候補化合物が同定された検出ピークの相対面積値を 3 群間または 2 群間で比較検討した。測定およびデータ処理は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (株) に委託した。

4. 研究成果

(1) REP・RBP による糖尿病および糖尿病性腎症進行抑制作用の評価

試験終了時のHbA1cは、REP・RBP両群ともC群に比べて約25%低値であった($p < 0.01$)。一方、インスリン感受性作用を有する血清アディポネクチン濃度は、REP・RBP両群とも約40-50%高値を示した($p < 0.01$)。また、REP・RBP両群の体重100g当たり肝臓重量は顕著に低く、血清総コレステロール濃度や肝機能マーカー(AST、ALT、ALP)はいずれも約40-60%も低値を示した($p < 0.01$)。以上より、本試験においてもREP・RBPの摂取は糖尿病の進行や肝臓への脂質蓄積を明らかに抑制することを確認できた。

さらに、腎症の早期診断マーカーである尿中アルブミン排泄は、C群では4週目以降に著しい上昇がみられたが、REP・RBP両群とも有意に抑制され続け、試験終了時点では約60%も低値で、糖尿病性腎症の進行抑制は顕著であった。腎系球体のメサンギウムマトリックススコアもまた有意に低く、腎機能が保持されていることが確かめられた。

(2) REP・RBP 摂取が尿中代謝物質プロファイルに与える影響

REP と RBP 両群の尿中代謝物質プロファイルの比較

メタボローム解析の結果、候補化合物は258(カチオン156、アニオン102)個見出された。C群に比較して、REP群では86、RBP群では113の代謝物質で、それぞれ有意な変動がみられた。そこで、検出されたピークを用いて主成分分析を行ったところ、REPとRBPの摂取は、糖尿病や肝臓への脂質蓄積および腎症の進行に対して類似した抑制作用を有するにもかかわらず、対照のC群と比較して、全く異なる尿中代謝物質プロファイルを示すことが明らかとなった(図1)。

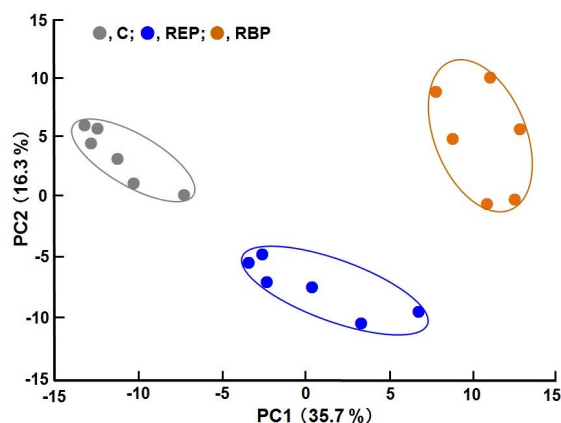


図1 米胚乳・米糠タンパク質を長期摂取したZDFラット尿中代謝物質の主成分分析(PCA) C、カゼイン; REP、米胚乳タンパク質; RBP、米糠タンパク質。

REP 摂取により有意な変動がみられた代表的な尿中代謝物質

今まで、特にREPについて重点的に研究を進めてきた経緯から、さらにREP群とC群の2群間で解析を行った。主成分分析では第1主成分得点(PC1)は38.6%、第2主成分得点(PC2)は17.1%となり、階層的クラスタ解析の結果をヒートマップで図2に示した。

REP摂取により変動がみられた主要な代謝物質は、カルニチン代謝関連代謝物質、尿素サイクル関連代謝物質、トリプトファン(Trp)代謝関連代謝物質などであった。カルニチン代謝関連代謝物質の変動倍率は、Carnitine

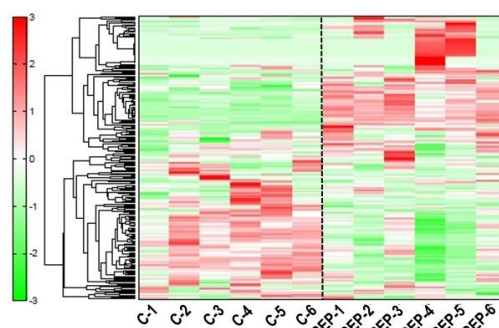


図2 米胚乳タンパク質を長期摂取したZDFラット尿中代謝物質の階層的クラスタ解析(HCA) C、カゼイン; REP、米胚乳タンパク質

2.3倍、Acetylcarnitine 1.6倍、 γ -Butyrobetaine 2.7倍で、既に解析した肝臓でも同様の増加変動がみられている²⁾。これらの代謝物質の尿中排泄への増加は、REP摂取が肝臓や腎臓でのCarnitine生合成を促進し、脂肪酸代謝亢進をとおして脂質・糖代謝を改善している可能性をより強く指示するものである。尿素サイクル関連代謝物質では、Arginine(Arg)、Ornithine、Citrullineが各々1.5倍、Guanidoacetic acidは1.4倍であったが、一方UreaやSarcosineは両者とも0.7倍と尿中排泄は減少していた。Trp代謝関連代謝物質では、尿中Trpは0.5倍に減少し、Kinurenic acidは1.3倍に増加していた。肝障害モデルでは、尿中へのTrp排泄は増加してKinurenic acidは減少するという報告がみられるので、REP摂取はTrp代謝をとおして肝障害抑制に寄与していることが示唆された。また、腎障害で尿中排泄が減少することが既にヒトやモデルマウスで報告されているHypuric acid排泄は、REP摂取で3.9倍に増加していた。さらに、糖尿病や慢性腎臓病(CKD)のなどの増悪因子として血管内皮細胞障害が指摘されているが、血管内皮細胞での一酸化窒素(NO)合成酵素の阻害物質とされるAsymmetric dimethylarginine(ADMA)は、REP摂取で減少(0.5倍)していた。以上の結果に他の尿中代謝物質の変動も加味して考察すると、REP摂取はC摂取に比べて、脂肪酸代謝亢進による脂質・糖代謝改善やTrp代謝改善が糖尿病の進行や脂肪肝を抑制し、これらの代謝改善が連動して尿素サイクル機能維持につながり、腎機能低下を強力に抑制していることが推察された。

(3) 研究成果の意義

2型糖尿病はCKDや高血圧症との関連が密接で、両者の合併によりそのリスクは相乗的に増

大する。また、肥満は多くの疾患の要因になっている。高齢化率 27.7% (2018) と世界第一の超高齢化社会のわが国では、生活習慣病が急激に増大して医療費高騰を招き、特に糖尿病性腎症は社会的重点課題で、2016 年には糖尿病性腎症重症化予防プログラムが策定された。現在、わが国の CKD 診療ガイドライン 2018 では、病態ステージによりタンパク質制限が推奨されているが、摂取タンパク質の「質の相違」については全く触れていない。一般にタンパク質制限のためには、主食として低タンパク米が利用されているのが現状である。動物試験における本研究成果をそのままヒトに外挿はできないけれども、摂取タンパク質の「質の相違」が CKD 患者の病態進行を抑制して QOL の改善につながる可能性は非常に大きい。それゆえ、REP の糖尿病、脂肪肝および腎症進行抑制効果の作用メカニズムを解明することは、タンパク質の「質の相違」について新知見を提供することになる。また、米を中心とした伝統的食生活を栄養学的に再評価することになり、医療費軽減とともに米の消費拡大につながるの、その社会的意義は多大である。さらに、米タンパク質素材を利用した新しい高付加価値の食品開発も期待できる。

(4) 今後の展望

REP と RBP の糖尿病や糖尿病性腎症に対する影響に明確な差異はみられないにもかかわらず、尿中代謝物質プロファイルは明らかに異なっていた。これより、REP の長期摂取による糖尿病や肝臓脂質蓄積抑制効果、腎機能改善効果の作用メカニズム解明は、RBP 摂取の場合の肝臓および尿中代謝物質を網羅的かつ詳細に比較検討することにより、さらに進展させることができると考えている。

< 引用文献 >

Masatoshi Kubota, Reiko Watanabe et al.: Rice protein ameliorates progression of diabetic nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high-sucrose feeding. *Br J Nutr*, **110**, 1211-1219, 2013.

DOI: 10.1017/S0007114513000354

5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕の

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Motoni Kadowaki, Masatoshi Kubota, Reiko Watanabe: Mini-Review; Physiological multifunctions of rice proteins of endosperm and bran. *J Nutr Sci Vitaminol*, 査読有, 2019. in press.

Michihiro Hosojima, Hisaki Shimada, Yoshitsugu Obi, Shoji Kuwahara, Ryohei Kaseda, Hazuki Kondo, Mikio Fujii, Reiko Watanabe, Yoshiki Suzuki, Motoni Kadowaki, Shigeru Miyazaki, Akihiko Saito: A randomized double-blind, crossover pilot trial of rice endosperm protein supplementation in maintenance hemodialysis patients. *Scientific Reports* 7:18003, 査読有, 2017.

DOI:10.1038/s41598-017-18340-8

Masatoshi Kubota, Reiko Watanabe, Miki Yamaguchi, Michihiro Hosojima, Akihiko Saito, Shinobu Fujimura, Motoni Kadowaki: Rice endosperm protein slows progression of fatty liver and diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Nutr*, **116**, 1326-1335, 査読有, 2016.

DOI:10.1017/S0007114516003512

Michihiro Hosojima, Ryohei Kaseda, Hazuki Kondo, Mikio Fujii, Masatoshi Kubota, Reiko Watanabe, Naohito Tanabe, Motoni Kadowaki, Yoshiki Suzuki, Akihiko Saito: Beneficial effects of rice endosperm protein intake in Japanese men with risk factors for metabolic syndrome: a randomized, crossover clinical trial. *BMC Nutr*. 2:25, 査読有, 2016.

DOI:10.1186/s40795-016-0065-7

〔学会発表〕(計 11 件)

Reiko Watanabe: Rice bran protein affects metabolome profile in obese type 2 diabetic rats. The 3rd International Symposium on Rice Science in Global Health. 2018.

Masatoshi Kubota: Rice bran protein suppresses deterioration of bone microstructure and strength in obese type 2 diabetic rats. The 3rd International Symposium on Rice Science in Global Health. 2018.

Motoni Kadowaki: New physiological functions of rice proteins of endosperm and bran. The 3rd International Symposium on Rice Science in Global Health. 2018.

久保田 真敏: 米胚乳タンパク質摂取が 2 型糖尿病モデルラットの尿中代謝物質プロファイルに与える影響, 第 72 回日本栄養・食糧学会大会, 2018.

Reiko Watanabe: Beneficial effects of rice endosperm protein on chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) in Zucker diabetic fatty rats. 21st International Congress of Nutrition. 2017.

Masatoshi Kubota: Beneficial effect of rice endosperm protein on IgE production. 21st

International Congress of Nutrition. 2017.

Syogo Sugaki: Rice bran protein has beneficial effects on chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) in type 2 diabetic ZDF rats. The 3rd International Conference on Rice Bran Oil. 2016.

Masatoshi Kubota: Rice bran protein has beneficial effects on diabetes, fatty liver and diabetic nephropathy, The 3rd International Conference on Rice Bran Oil. 2016.

〔その他〕(計 1 件)

シンポジウム

久保田 真敏, 渡邊 令子, 熊谷 武久, 斎藤 亮彦, 門脇 基二: 米胚乳タンパク質の特性と糖尿病合併症に対する有効性, 第 70 回日本栄養・食糧学会大会, 2016.

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称: タンパク質栄養組成物

発明者: 門脇 基二、斎藤 亮彦、細島 康宏、久保田 真敏、渡邊 令子、藤井 幹夫

権利者: 新潟大学、新潟県立大学、亀田製菓株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 6139150 号

取得年: 平成 29 年

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 門脇 基二

ローマ字氏名: (KADOWAKI, motoni)

研究協力者氏名: 久保田 真敏

ローマ字氏名: (KUBOTA, masatoshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。