

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500983

研究課題名(和文)米タンパク質摂取による糖尿病性腎症等の腎機能改善効果の解析

研究課題名(英文)Suppressive effects of rice proteins on progression of kidney disease in type 2 diabetic model rats

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病非肥満モデルGoto-Kakizakiラットにおける米胚乳タンパク質(REP)の腎症進行抑制効果は、腎臓のMCP-1発現上昇抑制が関与していることが示唆された。肥満モデルZucker Diabetic Fattyラットでは、REP、米糠タンパク質(RBP)ともに腎症進行抑制効果に加えて血糖上昇抑制及び肝臓脂質蓄積抑制が顕著であった。その肝臓及び腎臓の遺伝子発現応答解析より、REPとRBPでは異なるが、肝臓では解糖系酵素関連遺伝子の発現増加など、腎臓では炎症反応抑制および酸化ストレス軽減による可能性が推察された。

研究成果の概要(英文)：Ameliorative effect of rice endosperm protein (REP) on diabetic nephropathy was suggested to be caused by the suppression of renal MCP-1 rise in non-obese, spontaneous type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. In Zucker Diabetic Fatty rats, which are an animal model of obese type 2 diabetes mellitus, dietary REP and rice bran protein (RBP) delayed in the progression of renal failure. In addition, REP and RBP markedly suppressed lipid accumulation in the liver and improved glucose homeostasis parameter such as hemoglobin A1c. The analysis of gene expression data of the liver and kidney obtained using microarray experiments showed both the effect of rice proteins on contributing to the increased expression of glycolytic enzyme-related genes in the liver and, in the kidney, the decrease of inflammatory gene expression, and the increase of oxidative stress-related gene expression.

研究分野：食生活学・食と栄養

キーワード：米胚乳タンパク質 米糠タンパク質 2型糖尿病 糖尿病性腎症 非肥満糖尿病モデルGKラット 肥満糖尿病モデルZDFラット

1. 研究開始当初の背景

米は世界的にみても、特にアジア地域では重要な食糧資源であり、わが国では昔から主食として生活・文化と深く結びついていて自給可能な唯一の食料である。米を中心的な食の基盤としている食パターンは、近年、健康維持・増進の観点からみて国際的にも認識を新たにされている。精白米のタンパク質は植物性タンパク質の中では最もアミノ酸価が高く良質なタンパク質供給源である。わが国では米の消費量が減少しているとはいえ、平成20年国民健康・栄養調査結果ではタンパク質供給源として、大豆等の豆類由来タンパク質(約6%)の2倍(約12%)で肉類、魚介類に次ぐ第3位に位置している。しかし、米の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。そこで、これまで主食としての精白米のタンパク質、いわゆる米胚乳タンパク質(rice endosperm protein; REP)の新規生理機能を追求するために、共同研究により高純度REPの大量調製法を確立し、REPの基礎的性質を明らかにしながら、新規生理機能の探索に取り組んできた。一方、精米過程で生成する米糠は年間約86万トンといわれ、その約46%が未利用資源として廃棄されている現状から、米糠成分の約14%を占めるタンパク質、いわゆる米糠タンパク質(rice bran protein; RBP)にも着目し、数年前からREPと同様に検討をしてきた。

前研究課題(課題番号: 21500812)では、日本人やアジア人種の2型糖尿病患者のよいモデルとされている非肥満2型糖尿病自然発症 Goto-Kakizaki (GK) ラットに、REPを長期摂取(10または15週間)させて、糖尿病および糖尿病性腎症に与える影響を検討した。その結果、糖尿病の一般的血中診断マーカーに対しては明確な効果がみられなかったものの、尿中アルブミン排泄量や腎糸球体障害度においては対照としたカゼイン(C)に比べ、REPは有意な抑制効果を示し、腎機能保持効果を有することを明らかにした¹⁾。

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の患者が多数である。そこで、REPが肥満2型糖尿病に対して同様の腎症進行抑制効果を示すかどうかを検証すること、またその作用メカニズムを解明するためにも非肥満と肥満2型糖尿病モデルを用いて比較検討する必要性が生じた。

2. 研究の目的

(1) 非肥満2型糖尿病モデル GK ラットに対する REP の長期摂取による腎機能保持・改善効果の作用機序解明のために、炎症性サイトカインの経時的変動を中心に検討する。

(2) 肥満2型糖尿病モデル Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットにおける糖尿病および腎機能に対する REP と RBP の長期摂取の影響について調べ、GK ラットに対すると同様の効果の有無を確認後は、両者を比較検討しながらその作用機序の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 米胚乳および米糠タンパク質

精白米を原料としている REP は、アルカリ抽出法によって調製された素材²⁾でタンパク質含有率は約90%で、亀田製菓株式会社から提供された。本タンパク質の特性については、既に報告している³⁾。一方、RBP は脱脂糠を原料として調製され、タンパク質含有率は約80%で機能性成分として知られている -オリザノール、フェルラ酸、p-クマル酸などの低分子化合物を除去した素材を築野食品工業株式会社から提供してもらった。なお、RBP は等電点電気泳動を行った後で SDS-PAGE を行う2次元電気泳動法を用いて解析した結果、REP とはタンパク質組成が全く異なることを確認している。両タンパク質素材の一般成分分析および主要ミネラル成分分析は、日本食品分析センターに依頼した。

(2) GK ラットの腎症進行に係る腎臓中サイトカインの遺伝子発現変動

糖尿病性腎症はさまざまなサイトカイン、特に monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、tumor necrosis factor- (TNF-)、transforming growth factor- (TGF-)、などの発現上昇により機能異常が起こり、これらのサイトカインの発現上昇は尿中アルブミン排泄の増加に先行して起こることが報告されている。そこで、これまでの検討結果をふまえ、試験期間は6週間と設定し、上記3種類のサイトカインの遺伝子発現変動を real time PCR 法により経時的(0、3、6週間後)に測定した。さらに、6週間後に採取した腎臓を用いてマイクロアレイ解析も行った。

供試動物は7週齢の GK 雄ラット(日本 SLC) 35 匹を用いた。実験飼料組成は AIN-93G に準じて REP とカゼイン(C;対照)のタンパク質レベルを CP20%とし、スクロースのみ3倍量の30%とした高スクロース飼料を供した。飼育成績、血漿インスリンなどの血中パラメータ、尿中アルブミンの測定も行った。

(3) ZDF ラットにおける糖尿病および腎機能に対する REP と RBP の影響とその作用メカニズムの解明

6週齢の雄 ZDF ラットに肥満型糖尿病でない健康な Zucker-lean ラット(日本チャールズリバー)を加えて、8週間の飼養試験を行った。ZDF ラットは C(対照)、REP、RBP の3群および Zucker-lean ラット(L)群で、4群とした。ZDF ラットでは、糖尿病やその合併症の病態が早期に明確に現れるので、実験飼料

組成はAIN-93Gに準じた標準飼料とした。空腹時血糖値と収縮期血圧の測定、採尿は定期的に実施した。試験終了時の採血、肝臓、腎臓等の採取、それらの保存方法やさまざまな項目の測定方法は、GKラットを用いた試験の場合に準じた¹⁾。ただし、肝臓および腎臓はTotal RNAの分解を防ぐため、臓器採取後直ちにTotal RNA抽出を行った。肝臓と腎臓のマイクロアレイ解析は、各群より5匹を選定して個体ごとにTotal RNAを調製し、群ごとにプールして解析に供した。C群の肝臓および腎臓のすべての遺伝子発現を1.0としたときに、REP、RBPおよびL群の肝臓と腎臓で相対値が「1.5以上を発現上昇」、「0.67以下を発現下降」とした。

4. 研究成果

(1) GKラットの腎症進行に係る腎臓中サイトカインの遺伝子発現変動からみた作用メカニズム

腎臓中のMCP-1、TNF- α 、TGF- β のreal time PCRによる測定結果より、2型糖尿病促進因子として注目されているMCP-1のみ、C群で6週間後に0週に比較して有意な遺伝子発現上昇がみられたが、REP群では変動はみられなかった。血漿インスリンやC-reactive protein (CRP)濃度もREP群では6週間後C群に比べて有意に低値($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)であり、MCP-1の遺伝子発現変動は血漿インスリンやCRP濃度の経時変化と連動しているようにみえた。

これらの結果を受けて、試験6週間後の腎臓のマイクロアレイ解析を実施した。データベースや先行研究から腎症進行に関連する可能性がある遺伝子として、heme oxygenase 1 (Hmox1)、glutathione peroxidase 2 (Gpx2)およびglutathione reductase (Gsr)がそれぞれ、2.5、2.7、1.6倍(vs C群)に発現上昇していた。これら3種類の酵素は抗酸化関連酵素であり、なかでもHmox1はMCP-1発現を抑制することが報告されている。また、食塩感受性高血圧に関係するras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)遺伝子は、C群に比べ相対値で0.6程度に発現下降していた。そこで、Hmox1とRac1の2遺伝子についてreal time PCR法により定量を試みたが、マイクロアレイ解析結果を再確認できたのは、Hmox1の遺伝子発現上昇であった。

以上から、REPは腎臓の抗酸化能を亢進させて酸化ストレスを軽減し、腎機能保持効果を発揮している可能性が示唆された。

(2) ZDFラットにおける糖尿病および腎機能に対するREPとRBPの影響とその作用メカニズムの解明

REPとRBPの糖尿病および腎症進行抑制効果への影響

試験期間中、経時的に測定した空腹時血糖値や収縮期血圧では有意な差はみられなかったが、試験終了時のHbA1cはREPおよびRBP

両群でC群に比べて有意に低値であり($p < 0.05$)、糖尿病の病態が改善されていることが推察された。血中パラメータでは、GKラットの試験結果と同様に、REP・RBP両群ともにアルカリホスファターゼ(ALP)やTC、加えて尿素窒素が有意に低値であった。

さらに、体重増加量には差はなかったものの、肝臓重量はC群に比べてREP・RBP群ともに低値を示し($p < 0.01$)、肝臓中の総脂質(total lipid; TL)、トリグリセリド(TG)および総コレステロール(TC)も肝臓重量に連動して低値であり、REP並びにRBP摂取は顕著な脂質蓄積抑制効果を示した。なお、本作用は特にRBPのほうが強力であった。

また、尿中アルブミンおよび無機リン排泄量、およびNAG活性もREP・RBP両群ともに有意に低値であった($p < 0.01$)。腎系球体組織障害抑制効果は、GKラットの場合と同様にREP・RBP両群ともにC群に比べ有効なことを確認した($p < 0.05$) (図1)。本抑制効果はREPがより優れていた。加えて、大動脈弓部の病理組織学的画像解析も行ったが、C群に比べて血管壁の厚さや組織学的な有意な変化はみられなかった。

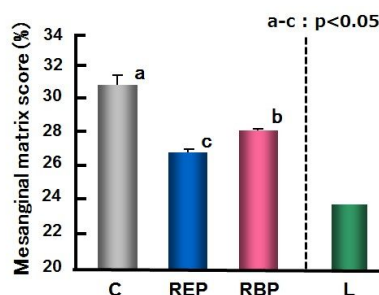


図1 REPおよびRBPを長期摂取したZDFラット腎臓のメサンギウムマトリックススコア

以上の結果から、肥満2型糖尿病モデルZDFラットにおけるREPおよびRBPの長期摂取で新たに確認された作用は、HbA1c改善効果と強力な肝臓への脂質蓄積抑制効果であった。

REPとRBPが肝臓および腎臓の遺伝子発現に与える影響

REPおよびRBPを長期摂取させたZDFラットの肝臓および腎臓の網羅的遺伝子発現解析の結果、肝臓で発現変動がみられた遺伝子数はREP群で6.5%、RBP群で10%、腎臓ではそれぞれ2.9%、5.1%と肝臓の半分程度であった。

肝臓では、RBP群で解糖系の律速酵素であるglucokinase (Gck)の発現上昇がみられた。一方、REP・RBP両群でinsulin-like growth factor binding protein 3 (Igfbp3)や脂肪酸合成経路の最初のステップの律速酵素であるacetyl-CoA carboxylase alpha (Acaca)などの遺伝子発現下降がみられた。さらに、RBP群では脂肪酸合成経路の律速酵素の一つであるstearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1)の発現低下も確認された。

腎臓では、GKラットにREPを摂取させた際

に発現上昇がみられた抗酸化関連酵素に加え、他の抗酸化酵素についても検討した。その結果、GK ラットの場合に発現上昇した遺伝子の発現変動は確認できなかった。ZDF ラットは実験動物の系統が全く異なることや糖尿病の病態の進行状況の相違等によることが考えられる。しかし、RBP 群では抗酸化酵素 superoxide dismutase 3 (Sod3) や glutathione peroxidase 3 (Gpx3) の遺伝子発現上昇が確認された。特に、Sod3 は C 群を 1.0 とした時の相対値で 2.4 倍に上昇していた。一方、ケモカインのリガンドおよびレセプター、インターロイキンなど炎症反応に関連する遺伝子群は、表 1 に示したように REP および RBP 両群で発現下降がみられた。

表1 ZDFラット腎臓の炎症反応関連遺伝子の発現変動

Gene name	Gene symbol	Fold change		
		REP	RBP	Lean
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Cx3cl1	0.63	1.24	1.14
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4	0.66	0.61	0.94
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4	0.82	0.58	0.63
chemokine (C-C motif) ligand 28	Ccl28	1.03	0.58	0.89
interleukin 18 receptor 1	Il18r1	0.63	0.49	0.91
interleukin 1 beta	Il1b	1.07	0.59	0.72
angiopoietin 2	Angpt2	0.70	0.67	0.86
angiopoietin-like 4	Angptl4	1.04	0.50	0.77

* 数値は、C群の遺伝子発現を1.0とした時のREP、RBPおよびLean (Zucker-leanラット) 群における遺伝子発現(相対値)を示している。青字は、発現下降。

以上より、REP 群における糖代謝改善効果は Igfbp3 の発現抑制を介し、腎症進行抑制効果は腎臓での炎症反応抑制が寄与している可能性が推察された。RBP 群では、Igfbp3 の発現抑制に加えて Gck の発現増加等が糖代謝改善に関与し、腎臓では Sod3 および Gpx3 の発現上昇による酸化ストレスの軽減や angiopoietin (Angpt) ファミリー遺伝子発現の低下等により腎機能が保持され、腎症進行を抑制していることが推察された。

(3) 今後の研究方向

REP および RBP の長期摂取による腎症進行抑制効果の機序解明のために実施した ZDF ラットの肝臓と腎臓のマイクロアレイ解析により、上記のような遺伝子群の変動がみられたが、あくまでも遺伝子レベルの結果にすぎない。今後、タンパク質レベルでの発現亢進や酵素活性の測定などの検討が必要である。さらに、メタボローム解析により肝臓と腎臓の代謝物質について群間比較し、本研究成果である遺伝子群の発現変動と合わせて検討することが、腎症進行抑制効果の機序解明につながると考え、研究を進めている。

(4) 研究成果の意義

肥満や 2 型糖尿病は世界的な規模で今後も爆発的な増加が予測されている。一方、糖尿病、脂質異常症、慢性腎臓病などの生活習慣病の発症と重症化には食事内容が深く関わっていることは明らかにされている。したがって、RFP および RBP、特に REP 摂取による腎機能改善効果や肝臓脂質蓄積抑制効果の解明は「米」の評価を高めて、米の消費拡

大につながる。

< 引用文献 >

5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕の

Takehisa Kumagai, Hiroyuki Kawamura, Takao Fuse, Toshiyuki Watanabe, Yuhi Saito, Takehiro Masumura, Reiko Watanabe, Motoni Kadowaki: Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol. 52, 467-472, 2006.

Takehisa Kumagai, Reiko Watanabe, Mariko Saito, Toshiyuki Watanabe, Masatoshi Kubota, Motoni Kadowaki: Superiority of Alkali-extracted rice protein in bioavailability to starch degraded rice protein comes from digestion of prolamin in growing rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, Vol. 55, 170-177, 2009.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Masatoshi Kubota, Yuhi Saito, Takehiro Masumura, Reiko Watanabe, Shinobu Fujimura, Motoni Kadowaki: In vivo digestibility of rice prolamin/protein body-I particle is decreased by cooking. *J Nutr Sci Vitaminol*, 査読有, Vol. 60, 300-304, 2014.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/60/4/60_300/_pdf

Masatoshi Kubota, Reiko Watanabe, Hideyuki Kabasawa, Noriaki Iino, Akihiko Saito, Takehisa Kumagai, Shinobu Fujimura, Motoni Kadowaki: Rice protein ameliorates progression of diabetic nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high-sucrose feeding. *Br J Nutr*, 査読有, Vol. 110, 1211-1219, 2013.

DOI: 10.1017/S0007114513000354

〔学会発表〕(計 24 件)

Masatoshi Kubota: Rice endosperm protein has the beneficial effect on diabetes and diabetic nephropathy in obese type 2 diabetic model rats, East Asia Conference on Standardization of Rice Function, Kyoto Research Park (Kyoto), December 10-12, 2014.

Motoni Kadowaki: Discovering new

physiological functionalities of rice protein. East Asia Conference on Standardization of Rice Function, Kyoto Research Park (Kyoto), December 10-12, 2014.

久保田真敏：肥満2型糖尿病ZDFラットの骨代謝に対する米糠タンパク質摂取の有効性，第8回日本アミノ酸学会学術総会，東京農業大学（東京都），2014年11月8-9日。

渡邊令子：米胚乳タンパク質摂取が肥満2型糖尿病モデルZDFラットの肝臓中代謝物質に与える影響，第68回日本栄養・食糧学会大会，酪農学園大学（北海道・江別市），2014年5月31日。

渡邊令子：米糠タンパク質摂取が肥満2型糖尿病ZDFラットの骨およびCa・P代謝に与える影響，第68回日本栄養・食糧学会大会，酪農学園大学（北海道・江別市），2014年5月31日。

Reiko Watanabe: Rice protein ameliorates progression of diabetic nephropathy in non-obese diabetic GK rats, INNS 20th International Congress of Nutrition, Granada, SPAIN, September 15-20, 2013.

Masatoshi Kubota: Effects of rice protein on glucose homeostasis and diabetic nephropathy in obese diabetic ZDF rats, INNS 20th International Congress of Nutrition, Granada, SPAIN, September 15-20, 2013.

渡邊令子：米糠タンパク質摂取による糖尿病性腎症の進行遅延効果，第67回日本栄養・食糧学会大会，名古屋大学東山キャンパス（名古屋市），2013年5月24-26日

久保田真敏：米胚乳タンパク質摂取による糖尿病性腎症進行遅延効果の作用メカニズム解明，第67回日本栄養・食糧学会大会，名古屋大学東山キャンパス（名古屋市），2013年5月24-26日

Reiko Watanabe: Dietary alkali-extracted rice protein improves some diabetic-related markers in obese type 2 diabetic rats, 2013 Experimental Biology. Boston, USA, April 20-24, 2013.

他

〔図書〕（計1件）

Motoni Kadowaki, Reiko Watanabe, Masatoshi Kubota, Takehisa Kumagai,

Takehiro Masumura: Digestibility, bioavailability, and beneficial effects of alkali-extracted rice protein. In: *RICE STUDIES, PRESENT AND FUTURE*, Commemoration of Second International Symposium on Rice and Disease Prevention, 小川誠一郎編，三共出版，東京，p.123-135, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：米糠タンパク質を含む糖尿病性腎症進展抑制用栄養組成物

発明者：門脇基二、久保田真敏、斎藤亮彦、細島康宏、渡邊令子、橋本博之

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2013-118021 号

出願年月日：平成 25 年 6 月 4 日

国内外の別：国内

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：同上

種類：特許

番号：特許願 2013-017197 号

出願年月日：平成 25 年 1 月 31 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 令子 (WATANABE, Reiko)

新潟県立大学・名誉教授

研究者番号：7 0 1 4 1 3 4 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

門脇 基二 (KADOWAKI, Motoni)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：9 0 1 2 6 0 2 9

(4) 研究協力者

久保田 真敏 (KUBOTA Masatoshi)

新潟大学・超域学院・助教

研究者番号：0 0 5 9 5 8 7 9