

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700839

研究課題名(和文)慢性腎臓病における低たんぱく食への分岐鎖アミノ酸添加と運動による筋代謝改善効果

研究課題名(英文)Combination of walking exercise and branched chain amino acid recovered response of protein synthesis in low protein diet fed chronic kidney disease model rats.

研究代表者

吉田 卓矢 (Yoshida, Takuya)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80622448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低たんぱく食は慢性腎臓病(CKD)患者における食事療法であるが、CKD患者の筋萎縮に関与していることが考えられる。そこで、本研究では、筋蛋白の合成を促進することが知られている分岐鎖アミノ酸の摂取や運動がCKDの腎機能や筋蛋白合成に与える影響をCKDモデルラットを用いて基礎的に検討した。その結果、CKDでは運動による筋蛋白合成の活性化が低下していることが明らかとなった。また、運動とともに分岐鎖アミノ酸を少量摂取することで、CKDモデルラットにおいて腎機能を低下させずに運動による筋蛋白合成を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Low protein diet (LPD) protects progression of renal injury in patients with chronic kidney disease (CKD). However, LPD may accelerate muscle wasting in these patients. The exercise and branched chain amino acid (BCAA) are known to increase the muscle synthesis. The aim of this study is to investigate whether walking exercise and BCAA would increase muscle protein synthesis in LPD fed CKD rats. The renal function was not different between LPD and BCAA containing LPD (BD) fed CKD rats, and the walking exercise did not accelerate renal damage in both LPD and BD fed CKD rats. The walking exercise increased the muscle synthesis in LPD and BD fed CKD rats. However, the muscle synthesis was lower in LPD fed CKD rats when compared with normal control rats and BD fed CKD rats. Combination of walking exercise and BCAA recovered the muscle protein synthesis in CKD rats. These results suggest combination of walking exercise and BCAA may be beneficial to improve the muscle protein synthesis in CKD.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：慢性腎臓病 分岐鎖アミノ酸 運動 低たんぱく食

### 1. 研究開始当初の背景

わが国の慢性腎臓病 (CKD) 患者は年々増加しており、特に末期腎不全患者を減少させることは国民の健康問題において緊急の課題となっている。末期腎不全患者では、たんぱく質の摂取を制限する低たんぱく食 (LPD) が推奨されている。しかし、LPD は腎機能低下を抑制することが知られているが、正しく行わないとエネルギー不足により低栄養状態を招く恐れがある。また、近年では CKD 患者において筋肉量の減少 (筋萎縮) が問題となっており、筋萎縮は患者の生活の質 (QOL) を低下させ予後を悪化させる要因の 1 つと考えられている。CKD 患者の QOL を保持し、透析導入までの期間を延長させるためには腎機能を保持するとともに筋肉量も維持できる効果的な食事管理と生活スタイルの提案が必要である。分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の摂取や運動は筋蛋白の合成を亢進させることが知られている。しかし、これまで CKD に対して、LPD に BCAA を添加したり、運動することにより筋蛋白代謝を改善させるかは明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

CKD はさまざまな合併症が複雑に合わさることにより筋萎縮を促進していると考えられている。CKD 患者において持続的な運動は筋蛋白代謝の低下を改善するという報告がある。一方で、運動が軽度であると筋蛋白の分解は抑制されるが、筋蛋白の合成は促進しないという報告がある。また、LPD は CKD における筋萎縮をさらに促進している可能性もある。本研究の目的は、LPD を摂取した状態で、BCAA の摂取や運動することが CKD の腎機能および筋蛋白の合成に与える影響を検討することである。

### 3. 研究の方法

本研究では、CKD モデルラットを作製し、LPD を与えた条件で BCAA の摂取や運動が CKD における腎機能および筋蛋白の合成に及ぼす影響を基礎的に検討した。

#### (1) 実験 1. LPD への BCAA 添加および運動による腎機能および筋蛋白の合成への影響

LPD に BCAA を添加して CKD モデルラットに与え、BCAA が腎機能および筋蛋白合成に与える影響を検討した。また BCAA の添加に加え運動した時の腎機能および筋蛋白合成についても検討した。9 週齢の雄性 Wistar ラットに麻酔下で 5/6 腎摘手術を行い、CKD モデルラットを作製した。CKD モデルラットは尿蛋白排泄量の増加と血中尿素窒素の増加を確認した後、LPD (タンパク質含量 6%) を与えた (CKD-LPD) 群、LPD に 3% BCAA を添加して与えた (CKD-BCAA) 群に分けた。また、前述の食餌に加え、週 5 日間トレッドミルで 20m/min、

1 時間運動させる群 (CKD-LPD+Ex 群、CKD-BCAA+Ex 群) も用意した。コントロールには開腹のみを行った (Sham) ラットを CKD モデルラットと同様に 4 群に分けて用いた。7 週間後に 24 時間尿、血漿、腎臓、ヒラメ筋を採取した。腎機能は血漿クレアチニンと 24 時間のクレアチニン排泄量からクレアチニンクリアランスを算出して評価した。また、筋蛋白合成の活性化を調べるため、ヒラメ筋を用いて筋蛋白合成のシグナル経路である p70s6kinase の発現量をウェスタンブロット法で調べた。

#### (2) 実験 2. LPD を与えた CKD ラットにおける少量の BCAA および運動による腎機能および筋蛋白合成への影響

BCAA の一つであるロイシンは、少量であっても筋蛋白合成を促進することが報告されているため、LPD の範囲内で一部のたんぱく質を BCAA に置き換えて CKD モデルラットに与え、BCAA による腎機能および筋蛋白の合成に与える影響を検討した。また、BCAA の摂取と運動の組み合わせによる筋蛋白合成の活性化に対する効果も検討した。実験には 9 週齢の雄性 Wistar ラットに 5/6 腎摘手術を行い、腎機能を低下させた CKD モデルラットを用いた。LPD (タンパク質含量 6%) を与えた CKD-LPD 群と LPD のたんぱく質含量 6% のうち 1% を BCAA に替えて与えた CKD-BCAA 群に分けた。また、前述の食餌に加え、週 5 日間トレッドミルで 15m/min、1 時間運動させる群 (CKD-LPD+Ex 群、CKD-BCAA+Ex 群) も用意した。また、コントロールには sham 手術を行ったラットを CKD モデルラットと同様に 4 群に分けて用いた。餌は 8 群間の摂取量が同量になるようにペアフィードで与えた。7 週間後に 24 時間尿、血漿、腎臓、ヒラメ筋を採取した。腎機能の評価はクレアチニンクリアランス、尿蛋白排泄量を用いた。また、腎臓の組織標本作製し、腎線維化を評価した。筋蛋白の合成を評価するため、ヒラメ筋のリン酸化 p70s6kinase の発現量および 4E-BP1 の発現量をウェスタンブロット法で調べた。また、炎症のマーカーであるインターロイキン-6 (IL-6) および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) のヒラメ筋における遺伝子発現量を real time-RT PCR を用いて調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 実験 1. LPD への BCAA 添加および運動による腎機能および筋蛋白の合成への影響

CKD モデルラットにおいて、尿蛋白排泄量は、BCAA を投与した群 (CKD-BCAA 群および CKD-BCAA+Ex 群) で CKD-LPD 群および CKD-LPD+Ex 群よりも有意に高値となった (図 1)。一方、運動は CKD モデルラットにおいて尿蛋白排泄量を増加させなかった。

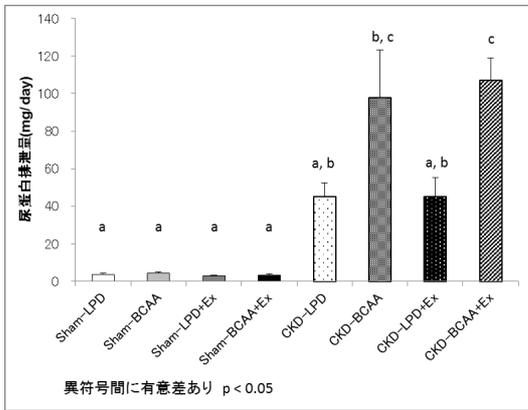


図 1. 尿蛋白排泄量 (実験 1)

また、BCAA は CKD モデルラットにおいて血中尿素窒素を増加させたが、運動は増加させなかった。クレアチンクリアランスは、有意差はなかったが、BCAA を与えた CKD モデルラットで LPD を与えたラットよりも低値であった。ヒラメ筋の重量は、Sham ラットと CKD モデルラットともに運動負荷をした群で運動を負荷していない群に比べ高値であった (図 2)。

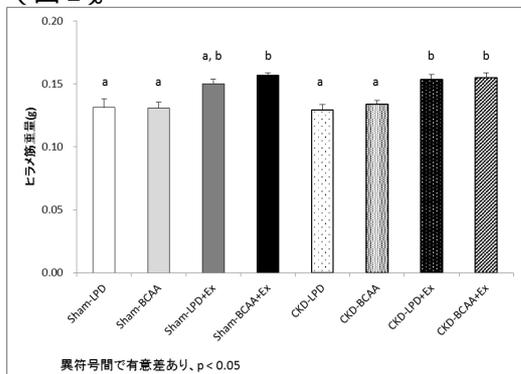


図 2. ヒラメ筋重量 (実験 1)

また、ヒラメ筋の p70s6kinase の発現は運動により増加する傾向があったが、BCAA 投与による効果は見られなかった。これらのことから、CKD モデルラットにおいて、低たんぱく食への 3% の BCAA の添加は尿蛋白を増加させることが明らかとなった。また、BCAA の摂取のみでは筋蛋白の合成が促進されないことが明らかとなった。一方、運動は LPD を摂取していても CKD モデルラットの筋肉量を増加させた。以上より、LPD を摂取していても継続した運動が筋肉量増加に有効であることが示唆された。また LPD への過剰な BCAA の添加は筋肉量を増加させず、むしろ腎機能に負担をかけることが考えられた。

## (2) 実験 2 . CKD ラットにおける LPD の範囲内での BCAA 摂取および運動による腎機能および筋蛋白合成への影響

実験 1 . では LPD に 3% の BCAA を添加することにより CKD モデルラットの腎機能を低下させることが明らかとなった。そのため、BCAA の摂取と運動による筋蛋白合成に対す

る相乗効果の有無が明らかにならなかった。そこで、実験 2 では BCAA を加えた LPD の窒素含有量が LPD と同量になるように、たんぱく源の一部を BCAA に置き換えて与えることで腎機能を低下させずに運動による筋蛋白の合成を促進することが可能か検討した。

その結果、CKD モデルラットにおいて、BCAA の摂取は LPD のたんぱく質摂取量の範囲内であれば尿蛋白排泄量を増加させず、クレアチンクリアランスを低下させなかった (図 3、図 4)。また、BCAA に加えて運動を行っても腎機能は低下しなかった。

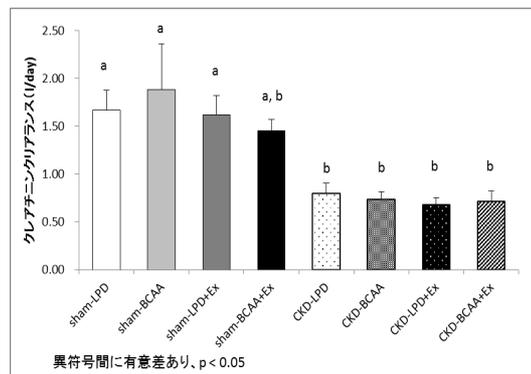
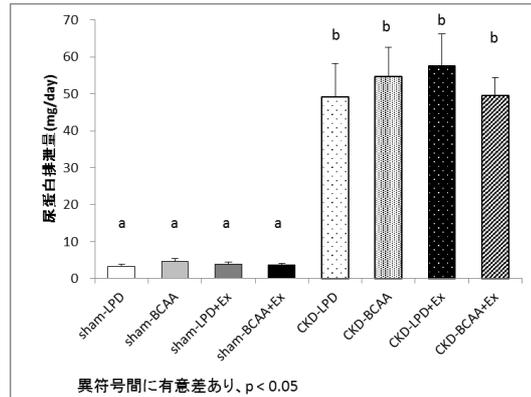


図 3. 尿蛋白排泄量 (実験 2)

図 4. クレアチンクリアランス (実験 2)

ヒラメ筋重量は、CKD モデルラットにおいて LPD 群、BCAA 群、LPD + Ex 群の間で有意な差はなかったが、BCAA+Ex 群で有意に高かった。ヒラメ筋のリン酸化 p70s6kinase の発現は運動した sham および CKD モデルラットの 4 群で運動していない群に比べ有意に高かった。しかし、CKD-LPD + Ex 群における p70s6kinase の発現は運動を負荷した Sham の 2 群より有意に低値だった。一方、CKD-BCAA+Ex 群における p70s6kinase のリン酸化は、運動を負荷した Sham の 2 群と同程度の発現量だった (図 5)。

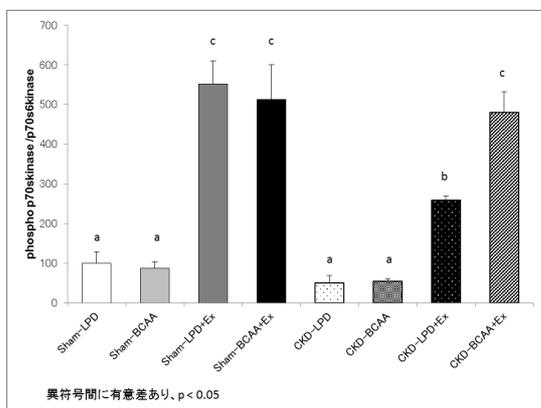


図5. ヒラメ筋におけるリン酸化 p70s6kinase の発現量

ヒラメ筋におけるリン酸化 p70s6kinase の発現量はヒラメ筋重量と有意な正の相関 ( $r = 0.734$ ,  $p < 0.001$ ) があることから、CKD モデルラットにおいて運動とともに LPD の範囲で BCAA を用いることは、腎機能に影響を与えずに筋重量を維持するために有効であることが示唆された。

また、運動は炎症性サイトカインを増加させることが報告されている。CKD において炎症は筋萎縮を促進する因子として知られているため、筋肉内における IL-6 および TNF- $\alpha$  の遺伝子発現量を調べた。その結果、運動を负荷した群では IL-6 の発現が著しく増加していた。一方、TNF- $\alpha$  の発現量は増加していなかった。このことから筋肉内で増加した IL-6 は炎症性サイトカインとしてではなく、筋蛋白の合成を促進するマイオカインとして発現していることが考えられた。

以上の結果から、CKD モデルラットにおいて運動は腎機能を低下させずに筋蛋白の合成を促進させることが明らかとなった。しかし、LPD を摂取した CKD モデルラットでは運動による筋蛋白合成のシグナルの活性化が低下していた。一方、LPD のたんぱく質摂取量の範囲内で BCAA を摂取すると CKD モデルラットにおいて低下した筋蛋白の合成を改善することが明らかとなった。

これまでに CKD の食事療法は腎機能の保持を目的とした LPD が用いられてきたが、近年 CKD 患者において問題となっている筋萎縮の予防については考慮されていない。本研究は、CKD モデルラットを用いて LPD を与えた条件で BCAA の摂取と運動が腎機能に影響を与えずに筋蛋白の合成を促進させることを初めて明らかにした。また、本研究の結果から BCAA の摂取は運動しない状態では効果がないだけでなく、過剰に摂取すると腎機能を低下させる可能性を示した。今後は、CKD において筋蛋白の合成を促進させる BCAA の最小量や最適な運動強度を明らかにする必要がある。また、BCAA の摂取や運動による筋蛋白の合成促進作用が CKD における予後に影響するか検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

吉田卓矢、慢性腎臓病モデルラットの筋タンパク代謝における分岐鎖アミノ酸摂取と運動負荷の効果、第 1 回腎と栄養研究会、2014 年 9 月 27 日、東京

吉田卓矢、慢性腎臓病ラットの筋肉代謝における分岐鎖アミノ酸摂取と運動負荷の相乗効果、第 57 回日本腎臓学会、2014 年 7 月 5 日、横浜

吉田卓矢、慢性腎臓病モデルラットにおける分岐鎖アミノ酸摂取と運動負荷による筋タンパク代謝への相乗効果、第 4 回日本腎臓リハビリテーション学会、2014 年 3 月 29 日、福岡

吉田卓矢、慢性腎臓病モデルラットにおける分岐鎖アミノ酸の摂取と運動負荷による筋肉代謝への影響、第 17 回日本病態栄養学会、2014 年 1 月 12 日、大阪

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 卓矢 (YOSHIDA TAKUYA)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80622448