

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750047

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症に対する低たんぱく食療法におけるエネルギーバランスの検討

研究課題名(英文) Energy balance of the low protein diet on diabetic nephropathy

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症の食事では、たんぱく質の過剰摂取を控え、エネルギーを炭水化物もしくは脂質で充足させる必要がある。本研究では糖尿病性腎症に対する低たんぱく食療法における脂質と炭水化物の摂取比率の違いが腎機能におよぼす影響を基礎的に検討した。その結果、糖尿病性腎症モデルラットにおいて脂質の多い食餌は、炭水化物の多い食餌に比べ同程度のエネルギー摂取量であっても腎臓に異常な脂肪(異所性脂肪)を蓄積させ、腎機能を低下させることが示唆された。本研究の結果より糖尿病性腎症の食餌において炭水化物と脂質の摂取比率の違いが腎機能に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To compare the effects of a low carbohydrate and high fat diet with a traditional high carbohydrate and low fat diet on markers of blood glucose and renal function in the rats of diabetic nephropathy. In this study, high fat diet reduced renal function and injured renal tissue more than high carbohydrate diet, even under energy restriction conditions. The high fat diet induced the ectopic fat depots in the proximal tubular cells in the diabetic nephropathy model rats. These findings suggest that high fat diet not recommended in diabetic nephropathy.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：糖尿病性腎症 高脂肪食 低たんぱく食 脂肪蓄積

1. 研究開始当初の背景

我が国の慢性腎臓病(CKD)患者は年々増加しており、その原因の1つに糖尿病の増加が関係している。長年血糖コントロールが不良であった糖尿病患者は腎機能が低下して腎症を発症する。糖尿病性腎症の増加は透析患者の増加に大きく関わっており、近年では新規透析導入患者の原疾患の第1位になっている。糖尿病の食事療法は良好な血糖コントロールを目的とし、脂質や炭水化物を過剰に摂取しないようにすることが重要であるとされている。しかし、腎症を合併するとその食事は一変して、腎機能の悪化を遅延させるために、たんぱく質を制限する低たんぱく食に変わる。低たんぱく食ではたんぱく質から得られるエネルギーが減るため、脂質と炭水化物をしっかり摂りエネルギーを充足させることが重要であると考えられる。しかし、たんぱく質を制限する代わりに摂取するエネルギー源には脂質と炭水化物のどちらを優先して摂ると糖尿病性腎症の病態によいかは明確に示されていない。

2. 研究の目的

近年、糖尿病の治療において、高脂肪食と高炭水化物食の是非が議論されている。これまでに我が国で行われてきた糖尿病の食事療法は、主食を米とする日本人の食事に合わせて炭水化物を適度に摂りながらカロリーを制限して血糖をコントロールする方法である。近年新たな糖尿病の食事療法として食後の血糖上昇を抑制するために極端に炭水化物を減らす低炭水化物食が流行している。従来の食事は炭水化物が多いことから高炭水化物食と位置付けられ、一方で低炭水化物食は脂質の摂取量が増加するため高脂肪食と位置付けられる。糖尿病においてどちらの食事療法がよいかはこれまで多く議論されてきたが、明確な結論は出ていない。また、糖尿病の食事の流れから低たんぱく食療法を行う糖尿病性腎症においても有用なエネルギー源を明らかにすることが必要である。本研究の目的は糖尿病性腎症において脂質および炭水化物の摂取比率の違いが血糖コントロールおよび腎機能に与える影響を検討することである。本研究では糖尿病性腎症モデルラットに高脂肪食もしくは高炭水化物食を与え、血糖コントロールおよび腎機能への影響を基礎的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験 1. 低たんぱく食の脂質および炭水化物の摂取比率の違いが糖尿病性腎症モデルラットの血糖値および腎機能に及ぼす影響の検討

糖尿病性腎症モデルラットを作成し、低たんぱく食におけるエネルギー組成の違いが血糖値および腎機能に与える影響を検討した。7週齢の雄性SDラットに高脂肪食を与えて3週間飼育した後、尾静脈からストレブ

トゾトシン(STZ; 25mg/kg 体重)を投与して糖尿病を発症させた。STZ投与1週間後に右腎臓を摘出し、4週間高脂肪食を与えて飼育した。コントロールには開腹のみの模擬手術を行った同じ週齢のSDラットを用いた。糖尿病性腎症モデルラットおよびコントロールラットを体重、血糖値、血漿総コレステロール値、血漿トリグリセライド値、血中尿素窒素濃度が同程度になるように各2群、計4群に分けた。群分け後、糖尿病性腎症モデルラットおよびコントロールラットの各1群には炭水化物の多い低たんぱく食(たんぱく質:脂質:炭水化物=6:15:79)を与え(STZ+Carb群;n=7、Control+Carb群;n=7)、残りの群には脂質の多い低たんぱく食(たんぱく質:脂質:炭水化物=6:40:54)を与えた(STZ+Fat群;n=7、Control+Fat群;n=7)。試験食による飼育期間中は4群間の摂食量が同量になるようにペアフィードで与えて10週間飼育した。9週間後に経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を行った後、24時間尿、血漿、腎臓を採取した。腎機能は血漿クレアチニンおよび尿中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。腎臓は中性脂肪量の測定およびPAS染色による組織学的評価に用いた。

(2) 実験 2. 糖尿病性腎症モデルラットにおける高脂肪食による腎臓の脂肪蓄積への影響

過食により肥満、糖尿病を発症し、その後腎機能が低下する糖尿病性腎症モデルのHos:ZFDM-leprfaラットを用いて高脂肪食が腎機能を低下させるメカニズムを検討した。6週齢のHos:ZFDM-leprfa(DN)ラットおよびその正常対照ラットであるleprfa/(コントロール)ラットを搬入後、22週齢まで市販の固形飼料を自由摂食させ飼育した。21週齢時に24時間尿を採取し、DNラットにおいて尿蛋白排泄量の増加を確認した。DNラットおよびコントロールラットを体重、血糖値、血漿トリグリセライド、尿糖排泄量、尿蛋白排泄量、血中尿素窒素濃度の値が同等になるように各2群ずつ、計4群に分けた。糖尿病性腎症モデルラットおよびコントロールラットの一方の群は高炭水化物食(たんぱく質:脂質:炭水化物=14:15:71)を与える群(DN+Carb群;n=9、Cont+Carb群;n=9)とし、もう一方は高脂肪食(たんぱく質:脂質:炭水化物=14:40:46)を与える群(DN+Fat群;n=9、Cont+Fat群;n=9)とした。DN+Carb群とDN+Fat群、Cont+Carb群とCont+Fat群においてそれぞれエネルギーとたんぱく質の摂取量が同等になるようにペアフィードで試験食を与え7週間飼育した。7週間後にOGTTを行った後、24時間尿、血漿、腎臓を採取した。腎臓は組織学的評価および脂質代謝に関わる酵素群の遺伝子発言量の測定に用いた。

4. 研究成果

(1) 実験 1. 低たんぱく食の脂質および炭水化物の摂取比率の違いが糖尿病性腎症モデルラットの血糖値および腎機能に及ぼす影響の検討

STZ+Carb 群および STZ+Fat 群は Control+Carb 群および Control+Fat 群よりもペアフィードで飼育していた期間の体重が有意に低値だったが、STZ+Carb 群と STZ+Fat 群の間に有意な差は見られなかった。OGTT において STZ+Fat 群は STZ+Carb 群よりも血糖値が高い傾向を示した。また、STZ+Fat 群は STZ+Carb 群よりもクレアチンクリアランスが低い傾向を示した (図 1)。

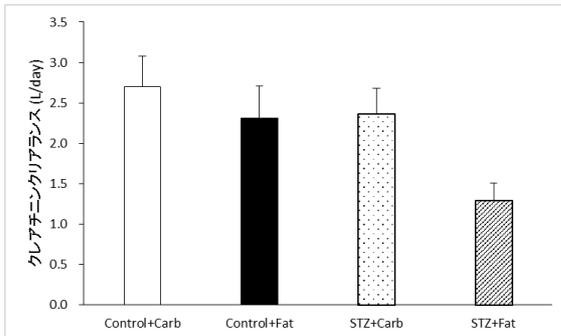


図 1. クレアチンクリアランス (実験 1)

STZ+Fat 群は血漿トリグリセリド濃度および血漿遊離脂肪酸濃度が他の 3 群よりも有意に高値だった (図 2)。

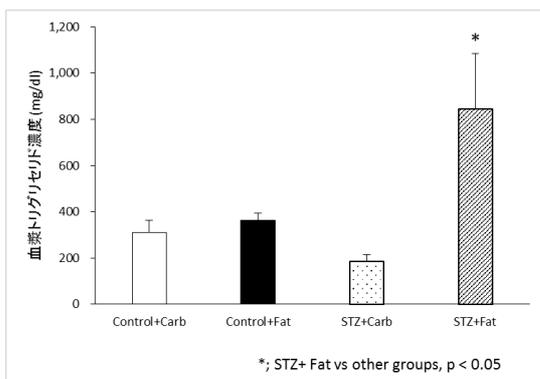


図 2. 血漿トリグリセリド濃度 (実験 1)

また、腎臓を PAS 染色により組織学的に評価した結果、STZ+Fat 群では他の 3 群では見られない近位尿細管の空胞化が見られた。腎臓における空胞は異所性脂肪の蓄積によると考えられたため、腎臓中の中性脂肪量を測定した。その結果、STZ+Fat 群は他の 3 群よりも腎臓の脂肪量が有意に高値だった (Control+Carb 群, 6.6 ± 0.4 ; Control+Fat 群, 6.8 ± 0.7 ; STZ+Carb 群, 7.5 ± 0.6 ; STZ+Fat 群, 10.3 ± 1.2 ; $p < 0.05$)。以上の結果より、脂質のエネルギー比率が高い低たんぱく食は、STZ を用いた糖尿病性腎症モデルラットにおいて血糖コントロールを悪化させ、さらに腎機能を低下させる可能性が示唆された。

(2) 実験 2. 糖尿病性腎症モデルラットにおける高脂肪食による腎脂肪蓄積への影響

高脂肪食を与えた DN+Fat 群は高炭水化物食を与えた DN+Carb 群よりも有意に体重が多かった。OGTT における血糖値は、ブドウ糖負荷後 60 分、120 分において DN+Fat 群が DN+Carb 群よりも有意に低値を示し、高脂肪食により血糖上昇が抑制された (図 3)。

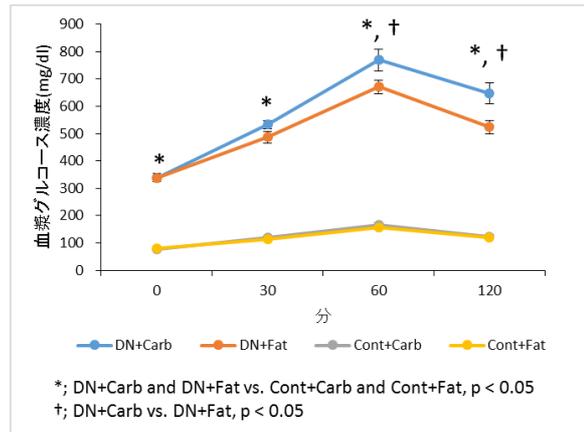


図 3. 血漿グルコース濃度 (実験 2)

一方、血中中性脂肪濃度、遊離脂肪酸濃度は DN+Fat 群が DN+Carb 群およびコントロールの 2 群に比べ有意に高値を示した。また DN+Fat 群は DN+Carb 群に比べクレアチンクリアランスが有意に低下していた (図 4)。

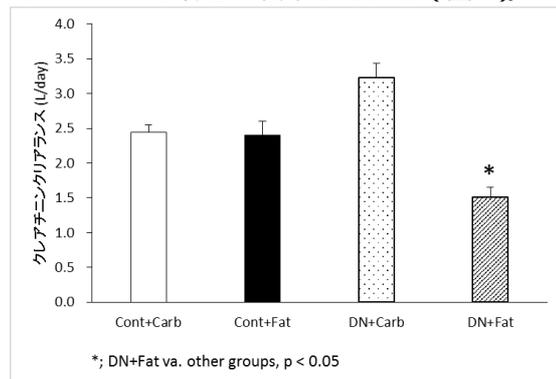


図 4. クレアチンクリアランス (実験 2)

次に腎臓をマッソントリクローム染色した標本を用いて糸球体の障害度を評価したところ、DN+Fat 群は DN+Carb 群よりも糸球体が障害されていることが明らかになった。また腎臓をオイルレッド O 染色により組織学的に観察したところ、DN+Fat 群は DN+Carb 群よりも近位尿細管に顕著に中性脂肪が蓄積していることが明らかになった (図 5)。

さらに高脂肪食による腎臓の障害について検討するため、腎臓におけるアポトーシスの促進因子 (Bax) および抑制因子 (Bcl-2) の遺伝子発現量を調べた。DN+Fat 群は DN+Carb 群よりもアポトーシスの促進を表す Bax/Bcl-2 の比が有意に増加していた。また、Bax/Bcl-2 比は腎臓の中性脂肪量と有意な相関を示した ($r = 0.55$, $p < 0.05$)。このこ

とから高脂肪食を摂取した糖尿病性腎症モデルラットにおける腎臓の脂肪蓄積は、腎障害と関連していることが考えられた。

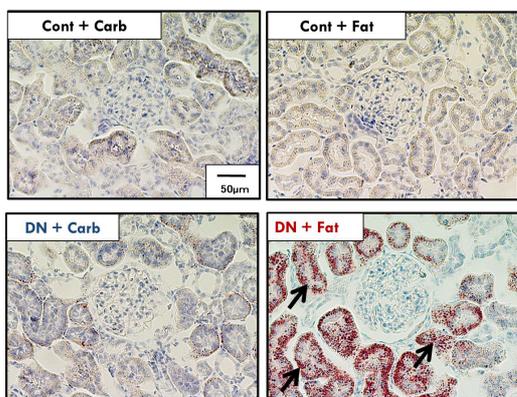


図5. オイルレッドO染色による腎臓の脂肪蓄積

脂肪蓄積のメカニズムを検討するため、腎臓の脂質代謝について検討した。脂肪酸合成酵素である Fatty acid synthase (Fas) および Acetyl CoA carboxylase (ACC) の遺伝子発現量を調べたが、Fas と ACC は DN+Fat 群において他の 3 群よりも有意に低下していた。次に脂肪酸取り込みに関わる CD36 の遺伝子発現量を調べた。腎臓における CD36 の遺伝子発現量は、Cont+Carb 群に比べ Cont+Fat 群では減少傾向だったが、DN+Fat 群は DN+Carb 群よりも増加傾向だった。また、中性脂肪の合成に関わる Diglyceride acyltransferase (DGAT) の遺伝子発現量を調べたところ、DN+Fat 群では DN+Carb 群に比べ DGAT2 の遺伝子発現量が増加していた。これらの脂質代謝に関わる酵素および受容体の遺伝子発現量の結果から、高脂肪食を摂取した糖尿病性腎症モデルラットでは、近位尿細管細胞において脂肪酸の取り込みが亢進していることや、細胞内の脂肪毒性を緩和するために DGAT2 を介した中性脂肪の合成促進により異所性脂肪が著しく蓄積した結果として腎障害が進展していることが考えられる。しかし、本研究では実際に基底膜側からの脂肪酸の取り込みが増加しているか検討できなかった。また、近位尿細管では脂肪酸が再吸収されることから、脂肪酸の再吸収による影響も考えられるため、今後は腎臓における異所性脂肪の蓄積についてさらに詳細に検討する必要がある。

以上の結果より、糖尿病性腎症モデルラットでは高脂肪食の摂取により食後の血糖値の上昇は抑制することが期待できるが、血中中性脂肪および遊離脂肪酸濃度を上昇させ、さらに腎臓の近位尿細管に脂肪を蓄積させることによって腎障害を進展させることが示唆された。

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)

[学会発表](計 3 件)

吉田卓矢、炭水化物および脂質の摂取比率が糖尿病性腎症モデルラットの腎臓に及ぼす影響、第 59 回日本腎臓学会、2016 年 6 月 17 日、神奈川県・横浜市

吉田卓矢、炭水化物および脂質の摂取比率が糖尿病性腎症モデルラットの腎臓に及ぼす影響、第 19 回日本病態栄養学会、2016 年 1 月 10 日、神奈川県・横浜市

吉田卓矢、渡邊菜月、池谷直樹、熊谷裕通：低たんぱく食の炭水化物および脂質の比率が糖尿病性腎症モデルラットの腎機能に及ぼす影響、第 27 回腎と脂質研究会、2015 年 4 月 18 日、石川県、金沢市

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