

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893116

研究課題名(和文)食餌中アミノ酸バランスが食餌制限中の各種臓器に与える影響

研究課題名(英文)The effect of dietary amino acids balance for mouse organs under caloric restriction.

研究代表者

山原 康佑 (YAMAHARA, KOSUKE)

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：50731915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、カロリー制限には寿命延長効果や細胞保護作用があることが知られている。以前、我々はアミノ酸バランスを改変した食餌を用いて、長期食餌制限実験を行った。食餌制限で得られた腎保護効果や寿命延長効果は、必須アミノ酸の負荷によって消失するという結果が得られている。しかし、腎以外の臓器に与えた影響に関しては不明であった。

そこで、マウスを増やして再実験を行い、耐糖能、上肢筋力、心機能について計測を行った。カロリー制限によって、耐糖能と心機能は改善傾向にあったが、上腕筋力は低下していた。アミノ酸の負荷により、カロリー制限による上腕筋力の低下は改善していたが、耐糖能が悪化する傾向があった。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that caloric restriction protects cell damages and prolongs life span. We conducted mouse experiment which is a diet restriction model by using the special diet which is modified the balance of amino acids. Life span and kidney function were improved in caloric restriction group compared to the ad libitum mice group, however these effects were canceled in essential amino acids-rich diet group. Amino acid modification diet may induce effects on life span and organ functions of mice.

To reveal the effects of dietary amino acids in other organs, we have conducted new experiments using diet restriction with amino acid modification. We analyzed glucose tolerance, muscle power and cardiac function. Caloric restriction improved the glucose tolerance, cardiac ejection fraction. On the other hand, muscle power was decreased in caloric restriction group. Amino acids rich diet improves muscle power induced by caloric restriction, however glucose tolerance tend to worsen.

研究分野：腎臓内科

キーワード：加齢 栄養学 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

現在、日本は高齢化社会を背景に、老化に伴う各臓器の機能異常・機能低下から生じる疾患が増加している。腎臓も多臓器と比較して老化に伴う変化が大きな臓器の一つであり、加齢・老化そのものが、糖尿病・高血圧・腎炎とは独立して腎予後の悪化因子であることが示されている。

我々の教室では加齢による腎機能低下に対する治療法として寿命延長効果のある食餌制限に着目し、“加齢に伴う Sirt1 活性の低下は、細胞内浄化機構オートファジーの活性化障害をもたらす、腎老化を促進するが、食餌制限はこれを改善する” (Kume S. et al. J Clin Invest. 2010)、ことを明らかにした。しかしながら、食餌は様々な栄養素を含有しており、どの栄養素の制限が上記効果を誘導したのかは不明であった。

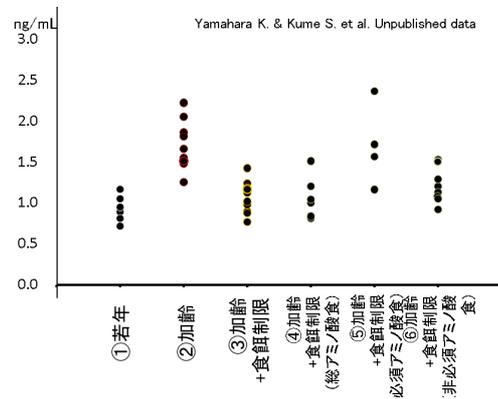
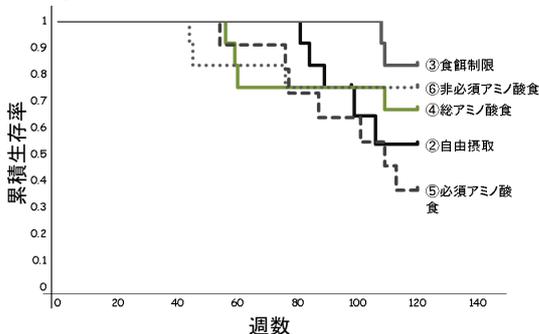
臨床現場では、腎機能を保護するために、食事の蛋白質制限が行われている。また、ショウジョウバエを用いた研究では、食事中的アミノ酸組成を変化させると、カロリー制限で得られた寿命の延長効果が消失するとの報告がある (Grandison RC et al, Nature. 2009)。このように、食餌中の蛋白質・アミノ酸はマウスの腎機能や寿命に対して影響を与えることが予想された。

そこで我々は 8 か月齢のマウスに対し、食餌中アミノ酸含有量を変化させた特別餌を用いた長期食餌制限実験を行った。腎機能マーカーである血清シスタチン C・尿細管障害マーカーである neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) を測定した。

その結果を下記図に示す。食餌制限を行うと腎機能が改善するが、必須アミノ酸を負荷した食餌を摂取した群では食餌制限による腎保護効果を失った。尿細管障害マーカーや腎組織所見も同様に必須アミノ酸を負荷した食餌の摂取で食餌制限による尿細管保護効果を失った。また、食餌内容により生存曲線にも変化が生じた。

これらの結果より、食餌中に付加するアミノ酸組成を変化させることが腎機能や寿命に影響を与えたと考えられる。

このように、食餌制限には腎保護などの利点があるものの、食餌のアミノ酸組成によって、効果が左右されるという興味深い知見を得た。



2. 研究の目的

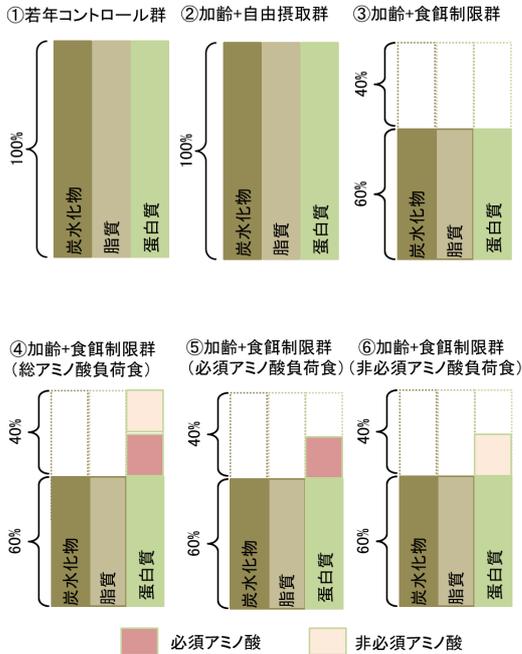
事前研究により、食餌中アミノ酸組成変化は腎機能に影響を与えることが示唆された。しかし、食餌中のアミノ酸組成を変化させることで、腎以外の臓器にも影響を与えたのかは不明であった。臨床への応用を考えた際に、腎とその他の臓器で細胞保護効果に違いが生じるのかどうか、または悪化する臓器がないのかどうかを明らかにすることは大変重要である。

臨床現場で食事中的蛋白質を制限することが腎機能の低下した患者に対して行われているが、実際に蛋白質を制限すると、筋力が低下することが知られており、高齢者に対する蛋白質制限食の導入は難しいとされる。我々は食餌中のアミノ酸組成を変化させることで、筋力低下を防ぎながら腎機能を保持することが可能ではないかと考えた。

そこで、新たにマウス数を増加させた再実験を行うこととした。腎以外の臓器、特に加齢で問題となる耐糖能・筋力・心機能について検討をすることとした。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウスに対し、アミノ酸を改変した食餌を与える。8 か月齢の若年コントロール群、24 か月齢でコントロール餌を自由摂取させた群、24 か月齢で全ての栄養素を 60% に制限した群、とアミノ酸摂取量が同等であるが他の栄養素は 60% に制限された群、必須アミノ酸摂取量が と同等であるが他の栄養素は 60% に制限された群、非必須アミノ酸摂取量が と同等であるが他の栄養素が 60% に制限された群、以上 6 群を用意する。



長期に及び食餌制限や食餌中のアミノ酸組成が、マウスの各種臓器に与える影響を検討するために、下記項目を評価する。

(1) 耐糖能評価：腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT)、腹腔内インスリン負荷試験 (IPITT) を施行し、耐糖能を評価する。腹腔内ブドウ糖負荷試験は、絶食状態のマウスに対し、ブドウ糖水溶液を腹腔内に注射し、経時的に尾静脈より採血を行い、血糖値を簡易血糖測定器で測定する。腹腔内インスリン負荷試験は、食後2時間経過したマウスに、インスリンを腹腔内注射し、経時的に尾静脈より採血を行い、血糖値を簡易血糖測定器で測定する。

(2) 上腕筋力評価：小動物筋力計を用いて、上腕の瞬間最大筋力を測定する。小動物筋力計にマウスの両手を掴ませ、筋力計と平行方向にマウスを緩徐に牽引する。マウスが両手を放した時点での筋力計の目盛りを記録する。十分なインターバルを置きながら10回測定し、その平均値を記録する。

(3) 心機能評価：小動物用超音波測定器を用いて、総合的な心機能の評価を行う。マウスにガス麻酔を用いて、心拍数が一定の範囲内になるよう麻酔深度を調整しながら、各種心機能パラメーターを計測する。左室長軸径、左室短軸径を測定し、左室駆出率を算出する。

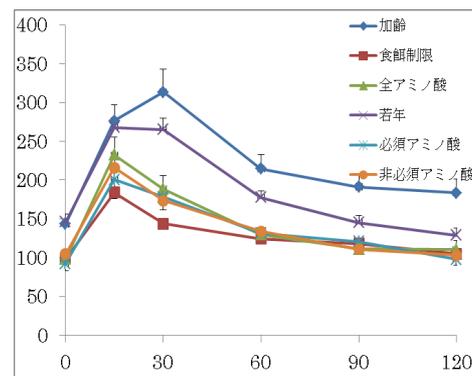
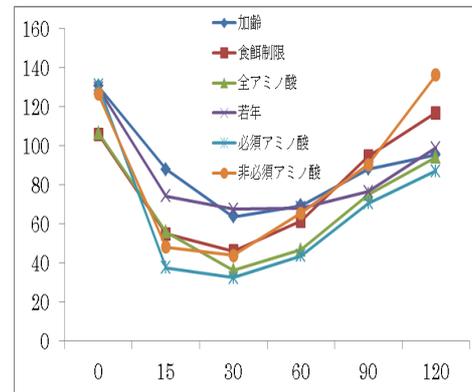
4. 研究成果

(1) 耐糖能評価：結果を下記図に示す。腹腔内糖負荷試験において、食餌制限により耐

糖能が改善した。しかし、アミノ酸改変食群では15分値ならびに30分値において耐糖能の改善効果が減弱する傾向が見られた。アミノ酸の量や組成による影響はなかった。また、腹腔内インスリン負荷試験において、食餌制限によるインスリン抵抗性の改善傾向が見られたが、アミノ酸の量や組成による影響は見られなかった。

これらの結果より、食餌中アミノ酸バランスの改変は、インスリン分泌能に影響を与えた可能性が示唆された。

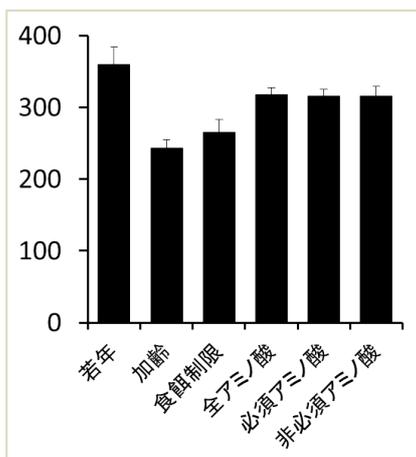
これまでに、マウスにおいて一部のアミノ酸の過剰投与により、インスリン抵抗性の上昇やインスリン分泌能の悪化などといった耐糖能が悪化するという報告がなされている。本実験では、アミノ酸改変食群は、自由摂食群に比べてもアミノ酸を多く摂取しておらず、アミノ酸“量”ではなく、“アミノ酸の組成”がマウスの耐糖能に影響を与えた可能性がある。



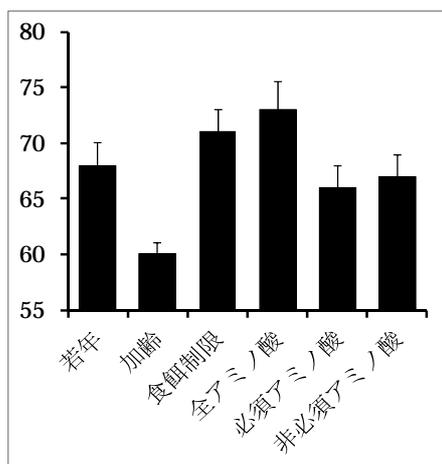
(2) 上肢筋力評価：結果を下記図に示す。食餌制限によって、上肢の瞬間最大筋力の低下が引き起こされていた。しかし、食餌制限によって引き起こされた筋力低下は、食餌中のアミノ酸負荷により改善する傾向にあった。負荷したアミノ酸組成の違いによる変化は見られなかった。

加齢によって、筋肉量が減少し、転倒や寝たきりの危険性が高まることがよく知られている。本実験より、抗老化作用・腎保護作用を目的に食事制限を導入すると、さらなる筋力低下を来たす危険性がより高まることが

予想される。しかし、食事中にアミノ酸を負荷することにより、筋力低下を防ぐことができる可能性がある。必須アミノ酸が豊富な食餌では寿命の短縮化や、腎機能の悪化が見られていたが、筋力ではアミノ酸の種類や組成による変化はなかった。



(3) 心機能評価：左室駆出率の結果を下記図に示す。加齢によって生じた左室駆出率の低下は、食餌制限によって改善する傾向が見られた。食餌中のアミノ酸量や組成の違いによる変化は見られなかった。加齢群に比べて食餌制限群では、体重が有意に減少し、さらに心室径も縮小していたため、心への容量負荷が減っていた可能性がある。心機能に関しては、アミノ酸バランスの変化による悪影響は確認できなかった。



これらの結果より、臓器には“食餌中のアミノ酸量”に影響を受けるものと、“食餌中のアミノ酸組成”に影響を受けるものがあることが示唆された。このような報告は過去には存在せず、非常に独創性のある研究結果と言える。

本研究は食事中のアミノ酸が、細胞内分子機構に特異的な影響を与えていることを示唆している。調節機構が明らかになれば、現在の臨床現場で行われている“総蛋白の量”による食事栄養指導から、各臓器に対する影響を考慮した“アミノ酸の組成”による指導へと、栄養指導も大きく変化しうる可能性がある。

り、今後詳細な分子機構を検討する必要がある。

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)

(1) Tagawa A, Yasuda M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Asanuma K, Kim E. H. Haneda M, Haneda M, Kajiwarra N, Hayashi K, Ohashi H, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. 「 Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy. 」『 Diabetes 』 db150473、2015年(査読あり)

(2) Yasuda-Yamahara M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. 「 Lamp-2 deficiency prevents high-fat diet-induced obese diabetes via enhancing energy expenditure. 」『 Biochemical and biophysical research communications, 』 第465巻、第2号、249頁-255頁、2015年(査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

(1) 山原康佑、久米真司、前川聡、宇津貴、「肥満関連腎症のメカニズムと展望」『第57回日本腎臓学会学術集会・総会』、横浜、2014年7月(口頭発表 シンポジウム招待講演)

〔図書〕(計1件)

(1) 久米真司、安田真子、山原康佑 「糖尿病性腎症克服に残された課題～挑戦発症メカニズムに立脚した治療の将来展望」『月刊糖尿病』2015年7月

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/kenkyu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山原 康佑 (YAMAHARA, Kosuke)

滋賀医科大学・医学部・客員助教
研究者番号：50731915

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし