

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00831

研究課題名(和文)新規経腸栄養剤開発を目指す機能性ペプチド成分に関する研究

研究課題名(英文)Functionality of peptide ingredients and development of new enteral nutrition products.

研究代表者

桑波田 雅士(Kuwahata, Masashi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：30304512

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)：糖尿病患者は、年々、増加の一途をたどっており、その結果、合併症を発症する患者も増加している。

本研究では、ゼラチン加水分解物(gelatin hydrolysate: GH)の摂取が、ストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルラットの血漿グルコース濃度の上昇を抑制することを見出した。GHによる血漿グルコース濃度調節機構の詳細は明らかではないが、少なくとも一部には糖尿病モデルラットの膵臓ランゲルハンス島における炎症反応の抑制作用が関与していると思われる。GHは糖尿病患者に対する経腸栄養剤の機能性成分の1つとして効果的であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of diabetes mellitus has been steadily increasing each year. As a result, the prevalence of complications from diabetes has also increased.

Present study found that supplementation of gelatin hydrolysate (GH) attenuated an increase in blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats. The detail mechanism by which GH regulates the blood glucose level in diabetic rats remains unclear. However, it appears that the repression of inflammation in pancreatic islets by GH has influenced, at least in part, the attenuation of increase in blood glucose level. GH has potential as an effective ingredient of enteral nutrition products for diabetic patients.

研究分野：栄養科学

キーワード：ゼラチン 加水分解物 糖尿病 血糖値 膵臓ランゲルハンス島

1. 研究開始当初の背景

平成 24 年「国民健康・栄養調査」の結果、糖尿病が強く疑われる者と糖尿病の可能性を否定できない者をあわせると約 2,050 万人におよぶことが示された。

「腸が使えるなら腸を使え」という言葉が示すように、臨床栄養管理では経腸的な栄養補給が基本となる。とりわけインスリン抵抗性を示す患者や糖尿病患者では、静脈栄養に比べて経腸栄養補給が血漿グルコース濃度変化の管理に優れている。現在、数種の糖尿病患者用経腸栄養剤が市販され、患者の栄養管理に利用されている。血漿グルコース濃度をコントロールする目的のため、殆どの製品は炭水化物含有量を低下させ、エネルギー確保は脂肪含有量を増加させることで対応している。そして脂肪の中でも一価不飽和脂肪酸を多く含有させることで付加的な機能性を期待した製品も存在する。また、食物繊維の機能性に期待して含有量を増やした製品や、腸管吸収速度を遅らせる目的で含有する糖質の種類を変更した製品などが存在する。しかしながら現在のところ、タンパク質成分に特徴をもたせた糖尿病患者用の製品は存在しない。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、ゼラチン加水分解物 (gelatin hydrolysate: GH) の機能性に関する研究をすすめる中で、飼料添加濃度依存的に糖尿病モデルラットの血漿グルコース濃度が低下することを見出ししていた。そしてこの GH 摂取による糖尿病モデルラットの血漿グルコース濃度低下作用は、GH の組成にあわせたアミノ酸混合物摂取では認められなかったことから、GH に含まれるペプチドの機能による効果と推察された。

本研究では、糖尿病患者用の医薬品に区分される経腸栄養剤の開発を最終目標としている。その目標を達成するためにも作用機構を解明することは必須である。本研究期間には、GH 経口摂取による糖尿病モデルラットの病態改善機構について検討し、GH の標的分子のレベルまで解明したいと考える。さらに本研究期間中に活性画分の濃縮をすすめ、可能であれば、活性ペプチドの単離、同定を実施することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) ストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラットの病態に及ぼす GH 摂取の影響

8 週齢の SD 系雄性ラットに対し、0.05M クエン酸緩衝液 (pH4.5) に溶解したストレプトゾトシン溶液を頸静脈へ投与 (45 mg/ml/kg 体重) することで、糖尿病を誘発した。ストレプトゾトシン投与後から 20%カゼイン食で維持した対照群、12%カゼイン+8%GH 食で維持した GH 摂取群に分け、1 週間飼育した。また一部のラットは、ストレプトゾトシン投与

後から 1 週間は 20%カゼイン食で維持し、その後 12%カゼイン+8%GH 食でさらに 1 週間飼育した。飼育期間終了後、深麻酔により安楽死させ、血液および膵臓を実験に供した。血液は血漿を分離し、生化学検査に供した。膵臓は、摘出時にコラゲナーゼで処理し、得られた細胞をフィコールの密度勾配遠心法で分離することでランゲルハンス島を単離した。そして単離したランゲルハンス島から Total RNA を抽出し、逆転写後、リアルタイム定量 PCR に供した。

(2) ストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラットの膵臓ランゲルハンス島に及ぼす GH 短期間摂取の影響

8 週齢の SD 系雄性ラットに対し、前項と同様にストレプトゾトシンを投与し、糖尿病を誘発した。ストレプトゾトシン投与後から 20%カゼイン食で維持した対照群、12%カゼイン+8%GH 食で維持した GH 摂取群に分け、自由摂食下で飼育した。3 日後、深麻酔により安楽死させ、血漿および膵臓を実験に供した。血漿は生化学検査に供し、膵臓は 10%ホルマリン溶液で固定し、ヘマトキシリン・エオシン染色法による組織学的検討に供した。また一部の動物から摘出した膵臓は、前項と同様にランゲルハンス島を単離し、Total RNA を抽出後、cDNA を合成してリアルタイム定量 PCR に使用した。

さらに一部の実験動物は、2 日間、それぞれの食事を給与し、その後 24 時間は絶食させた。翌日、40%グルコース溶液を胃内投与することで (5 mL/kg 体重) 経口糖負荷試験をおこなった。経時的に尾静脈採血をおこない、血漿グルコース濃度およびインスリン濃度を測定した。

(3) GH 摂取が健常ラットの GLP-1 分泌に及ぼす影響

24 時間絶食させた SD 系雄性ラットに対し、麻酔下で門脈にカテーテル挿入術を施行した。門脈血を採取した後、カゼイン溶液あるいは GH 溶液 (2.0 g/kg 体重) を胃内投与し、その 15 分後に再び門脈血を採取した。血液から血漿を分離し、ELISA キットを用いて Total GLP-1 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) ストレプトゾトシン投与直後からの GH 摂取が、糖尿病モデルラットの血漿グルコース濃度の上昇を抑制する。

ストレプトゾトシン投与 1 週間後における糖尿病モデルラットの血漿グルコース濃度を比較したところ、カゼインを摂取した対照群と比較して、GH 摂取群で血漿グルコース濃度の低下傾向は認められた。しかしながらこのグルコース濃度の低下は、我々が実施していた先行研究のような有意な差ではなく、個体差が見受けられた。そこで血漿グルコース濃度の変化と食事摂取量に関して詳細な

検討を実施したが、対照群、GH 群ともに、1 週間の食事摂取量と血漿グルコース濃度の間に関連は認められなかった（図 1）。しかしながら、ストレプトゾトシン投与後から 2 日間に限定した食事摂取量と 1 週間後の血漿グルコース濃度の関連について検討した結果、GH 摂取群で有意な負の相関が認められた（図 2）。一方、対照群ではこれらの間に関連は認められなかった。また、ストレプトゾトシン投与 1 週間後から GH 添加食を摂取させた動物では、血漿グルコース濃度の低下作用は認められなかった。

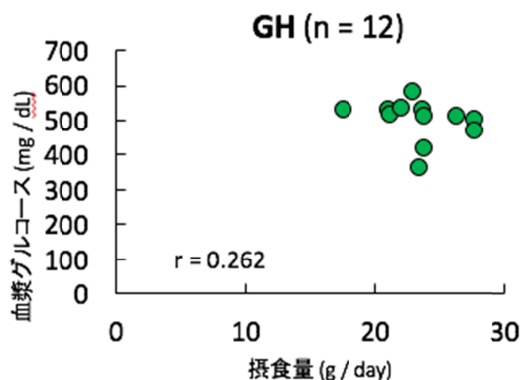


図 1. 7 日間の GH 摂取量と血漿グルコース濃度

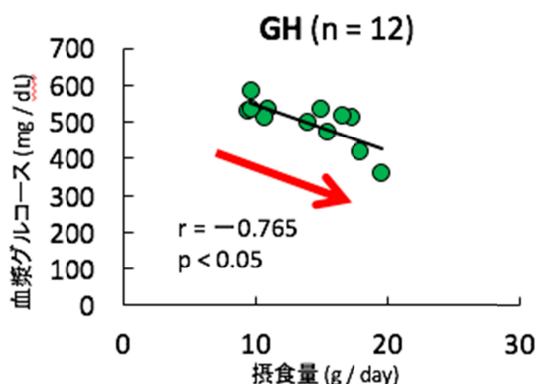


図 2. 2 日間の GH 摂取量と血漿グルコース濃度

膵臓ランゲルハンス島におけるインターロイキン-6 mRNA の発現量を検討したところ、対照群と比較して、GH 摂取群で低下傾向が認められ、炎症反応が抑制されている可能性も認められた。

これらの結果から、GH はストレプトゾトシンの膵臓ランゲルハンス島に対する傷害作用を軽減する機能を有していることから、ストレプトゾトシン投与直後の GH 摂取が、1 週間後の血漿グルコース濃度の上昇も抑制したと考えられた。

(2) GH 摂取はストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラットのインスリン分泌能低下と膵臓ランゲルハンス島における炎症関連分子の遺伝子発現を抑制する。

ストレプトゾトシン投与後 2 日間は、カゼイン食あるいは GH 添加食を摂取させ、その後 24 時間絶食を负荷したラットに糖負荷試

験を実施したところ、対照群と比較して、GH 摂取群では血漿グルコース濃度が測定した全ての時間で低値を示し、糖負荷 90 分後および 120 分後には有意な低値を示した。一方、血漿インスリン濃度に関しては、対照群と比較して、GH 摂取群で測定した全ての時間で高値を示し、糖負荷 30 分後には有意な高値を示した。

膵臓の組織学的検討を実施したところ、視野あたりのランゲルハンス島の数に、対照群と GH 摂取群の間で有意な差は認められなかった。しかしながら、視野面積あたりのランゲルハンス島の占める面積割合について検討したところ、対照群と比較して、GH 摂取群で有意に広い面積を占めていた。

膵臓ランゲルハンス島における遺伝子発現について検討したところ、対照群と比較して、GH 摂取群で転写調節因子 NF- κ B mRNA 量が有意に低値を示し、IL-1、TNF- α 、TGF- β 1 などの炎症関連分子をコードする mRNA の発現量が低下傾向を示した。

これらの結果から、本実験条件における 2 日間の GH 摂取は、ストレプトゾトシン投与による膵臓ランゲルハンス島の炎症反応を抑制し、ランゲルハンス島を保護した結果、インスリン分泌能が維持され、血漿グルコース濃度の調節機構が保持されたと考えられた。

(3) GH 摂取は小腸からの GLP-1 分泌を刺激する。

健常ラットにカゼインあるいは GH を胃内投与したところ、カゼインでは投与 15 分後における門脈血中の GLP-1 濃度に変化は認められなかったものの、GH 投与では有意な上昇が認められた。この結果から、GH を経口摂取（経腸投与）することで、代表的なインクレチンである小腸 GLP-1 の分泌を誘導できると考えられた。

本研究では、GH の機能性に関連する標的分子の解明や、活性ペプチドの同定、濃縮には至らなかったが、GH は膵臓保護作用を有すると考えられている GLP-1 の分泌を刺激することで、ストレプトゾトシン投与で誘発される炎症反応を抑制し、膵臓からのインスリン分泌を維持する可能性を見出した。

すなわち本研究は、GH が膵臓を保護する機能性成分として、経腸栄養剤の開発に利用できる可能性を見出した。

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)

[雑誌論文](計 9 件)

(1) Kawahata M., Kobayashi Y. and Kido Y. (他 2 名, 1 番目) An oxidized/reduced state of plasma albumin reflects malnutrition due to an insufficient diet

in rats. J Clin Biochem Nutr, (査読有り) 60, 70-75 (2017) DOI: 10.3164/JCBN.16-33.

(2) Miki A., Kuwahata M. and Fukui M. (他6名, 6番目) Urinary pH reflects dietary acid load in patients with type 2 diabetes. J Clin Biochem Nutr, (査読有り) 61, 74-77 (2017) DOI: 10.3164/jcfn.16-118.

(3) Kobayashi Y., Kuwahata M. and Kido Y. (他9名, 6番目) Comparisons of dietary intake in Japanese with non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. J Clin Biochem Nutr, (査読有り) 59, 215-219 (2016) DOI: 10.3164/jcfn.16-7.

(4) Ogawa A., Kuwahata M. and Kido Y. (他3名, 5番目) A simple evaluation method for the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation technique. J Nutr Sci Vitaminol, (査読有り) 61, 123-130 (2015) DOI: 10.3177/jnsv.61.123.

(5) Iwase H., Kuwahata M. and Fukui M. (他9名, 5番目) Lower vegetable protein intake and higher dietary acid load associated with lower carbohydrate intake are risk factors for metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes: Post-hoc analysis of a cross-sectional study. J Diabetes Invest, (査読有り) 6, 465-472 (2015) DOI: 10.1111/jdi.12326.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 白波瀬真子、桑波田雅士 他、2型糖尿病患者において尿 pH は食事性酸負荷を反映する、第20回日本病態栄養学会年次学術集会(2017)

(2) 山本百希奈、桑波田雅士 他、ヒトでの標識アミノ酸酸化法によるタンパク質の質評価の検討、日本アミノ酸学会第11回学術大会(2017)

(3) 桑波田雅士、小林ゆき子 他、ラット血漿アルブミンの酸化還元動態は食事性低栄養状態を反映する、日本外科代謝栄養学会第53回学術集会(2016)

(4) 小林ゆき子、桑波田雅士 他、非アルコール性脂肪性肝疾患および糖尿病患者における食品摂取の相違点、第18回日本病態栄養学会年次学術集会(2015)

(5) 長谷川万莉、桑波田雅士 他、食事制限はラットの還元型アルブミン比率を低下させる、第62回日本栄養改善学会学術総会(2015)

〔図書〕(計 1 件)

(1) Kuwahata M. and Kido Y. The branched chain amino acids in clinical nutrition. ed. by Rajendram R, Preedy VR, Patel VB. Humana Press, 総頁数 333 頁、担当 159-168 頁 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑波田 雅士 (KUWAHATA, MASASHI)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：30304512