

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21004

研究課題名(和文)慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常に対する米胚乳・米糠タンパク質の有効性

研究課題名(英文)Beneficial effects of rice endosperm and bran protein on chronic kidney disease-mineral bone disorder

研究代表者

久保田 真敏 (Kubota, Masatoshi)

新潟大学・研究推進機構・特任助教

研究者番号：00595879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、米胚乳タンパク質(REP)および米糠タンパク質(RBP)の摂取が糖尿病モデルZDFラットの慢性腎疾患に伴うミネラル・骨代謝異常に与える影響を明らかにすることを目的とした。ZDFラットにREP、RBPを10週間摂取させると、糖尿病および糖尿病性腎症の進行が遅延され、血中リンの調節因子であるFGF23の有意な改善がみられた。さらに骨微細構造の劣化が抑制され、骨強度が有意に改善することが示された。以上の結果より、REP、RBP摂取がCKD-MBDの進行を遅延させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to clarify effects of rice endosperm protein (REP) and rice bran protein (RBP) on chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) in type 2 diabetic model rats. Male ZDF rats were employed and fed a REP and RBP diet for 10 weeks. Hemoglobin A1c, a marker for diabetes, and urinary albumin excretion, a diagnostic criterion of diabetic nephropathy, were significantly suppressed by consuming REP and RBP compared with casein (C). These results strongly suggest that REP and RBP ameliorated diabetes and diabetic nephropathy. Fibroblast growth factor 23, one of the regulating factors for phosphate in blood, in the REP and RBP groups significantly suppressed compared with the C group. In addition, femoral microstructures and bone strength deteriorated in ZDF rats compared with non-diabetic rats but the deterioration was suppressed by REP and RBP consumptions. Therefore, it is indicated that REP and RBP had suppressive effects on CKD-MBD in ZDF rats.

研究分野：栄養学、食品化学

キーワード：米胚乳タンパク質 米糠タンパク質 CKD-MBD ZDFラット

1. 研究開始当初の背景

米は日本人の主食であり、重要なエネルギー供給源であるという認識は持たれているが、タンパク質供給源としての重要性についてはあまり顧みられてこなかった。しかし、食品群別のタンパク質摂取量でみると、米は肉類、魚介類に次ぐ3番目に重要な供給源であり、その量は植物性食品の中では第1位を占めている(平成27年度国民健康・栄養調査, 厚生労働省, 図1)。このような供給面か

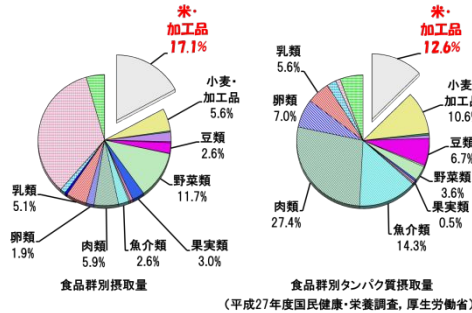


図1 食品群別摂取量ならびにタンパク質摂取量(20~29歳)

らの重要性にもかかわらず、米胚乳タンパク質(REP)の機能性に関する研究は、同じ植物性タンパク質である大豆タンパク質などと比較して、供給上の問題などからこれまであまり進んでこなかった。しかし近年になり、この供給上の問題が解決されつつあり、機能性研究を進める環境が整いつつある。

また精米時に生成する米糠については、約55%が米油生成に利用されているものの、米油回収後の残渣は肥料や家畜の飼料などへの利用がほとんどあり、食品への直接的な利用は非常に限られてきた。米糠は胚乳部と比較して、タンパク質含量が約2倍となっており、さらに脱脂後の米糠にはより濃縮された状態でタンパク質が存在していることから、米糠タンパク質(RBP)に新たな機能性が発見されれば、食品素材としての活用の幅が大きく広がることが期待される。このような米のタンパク質を取り巻く状況から、申請者らは米タンパク質の新規機能性を探索する研究を行ってきた。その過程でREPの脂質代謝改善作用(Yang *et al.*, 2008), GKラットにおける糖尿病性腎症の進行遅延作用(Kubota *et al.*, 2013), ZDFラットにおける糖尿病、糖尿病性腎症、脂肪肝の進行抑制作用(Kubota *et al.*, 2016)などを報告してきた。

糖尿病は世界規模で対策が重要視されている疾病であり、高血糖に由来するさまざまな合併症を引き起こすことが特徴である。代表的な糖尿病合併症の1つである糖尿病性腎症は、新規透析導入患者の原因疾患の第1位であり、医療費高騰の面からもその対策が重視されている。このような糖尿病を含む慢性腎疾患は腎機能の低下により、ミネラルや骨代謝の異常を引き起こすことが知られており、近年、慢性腎疾患に伴うミネラル・骨代謝異常(CKD-MBD)という概念が提唱され、現在注目を集めつつある。

2. 研究の目的

本研究では米、米糠タンパク質の新規機能性を発見することを目的に、近年注目を集めつつあるCKD-MBDに対する影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

飼育試験

供試動物として、肥満2型糖尿病モデル雄性 Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラット(体重 220-250 g) および同週齢、同系統の非糖尿病ラットである ZDF Lean ラット(170-190 g) を用いた。飼料はタンパク質源としてカゼイン(C), REP, RBP を用いて CP 20% に調製し、ZDF ラットに 10 週間給与した。なお、ZDF Lean ラットには C 食を 10 週間給与した。糖尿病の進行を評価するために、毎週空腹時血糖値を測定し、さらに糖尿病性腎症の進行を評価するために 0, 2, 4, 6, 8, 10 週目に尿を回収し、尿量および尿中アルブミンの解析に供した。なお本研究の全ての動物試験は、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得た後に行った。

空腹時血糖値ならびに糖尿病関連血中マーカーの測定

毎週 1 回 18 時間の絶食を行い、ジェントレット(三和化学研究所)を用いてラット尾部先端を穿刺し、グルコカード G ブラック(アークレイ株式会社)を用いて空腹時血糖値の測定を行った。ヘモグロビン A1c (HbA1c) は HbA1c 測定器(DCA2000, バイエルメディカル)を用いて測定し、インスリン(ラットインスリン測定キット, 株式会社森永科学研究所)およびアディポネクチン(マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット, 大塚製薬株式会社)はそれぞれ市販の ELISA キットを用いて測定した。

尿中アルブミン排泄の測定

0 (試験開始前), 2, 4, 6, 8, 10 週目に代謝ケージで 2 日間尿を回収し、尿量を測定した。尿中アルブミン濃度の測定は Albumin, Rat Urine, ELISA Kit, Nephurat II (Exocell, Inc.) を用いて行った。

血中ミネラル代謝関連因子の測定

血清中の FGF23 濃度および intact PTH 濃度の測定は、それぞれ FGF-23 ELISA Kit (株式会社カイノス), Rat Intact ELISA Kit (Immutopics, Inc.) を用いておこなった。また血中 P, Ca 濃度はそれぞれ酵素法, OCP 法で測定した。

血中骨代謝マーカーの測定

骨形成マーカーとして Gla-osteocalcin を Rat Gla-osteocalcin high sensitive EIA Kit (タカラバイオ株式会社)を用いて測定した。また骨吸収のマーカーとして、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性を TRACP & ALP

Assay Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて測定した。

骨微細構造の形態学的観察ならびに骨強度の測定

骨微細構造の形態学的観察は、マイクロフォーカス X 線装置 (SMX-100CT, 島津製作所) を用いて行い、撮影した画像の解析には TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング) を使用し、各骨評価パラメータを算出した。骨の力学的パラメータは、ラット大腿骨の 3 点曲げ試験により測定した。測定は骨強度/皮膚破断強度試験機 (TK-252C, 室町器械) を用いて行った。

統計解析

データは平均値 ± SEM で示し、解析は L 群を除いた 3 群で一元配置分散分析を用いて行った。なお有意差の検定は、Tukey-Kramer 法を用いて行った。

4. 研究成果

糖尿病および糖尿病性腎症に与える影響

C 群では 6 週目以降に著しい空腹時血糖値の上昇がみられ、糖尿病の発症が確認されたが、REP あるいは RBP 群ではその上昇が数週間程度遅れる傾向がみられた。また比較的長期間の血糖値の推移を反映する HbA1c は、C 群と比較して REP, RBP 群で有意に低値を示した ($P < 0.01$, 図 2)。一方、脂肪組織から分泌され、インスリン感受性を上昇させる作用を有していることが知られているアディポネクチンも、REP, RBP 摂取により有意に高値を示すことが明らかになった ($P < 0.01$)。以上の結果より、REP, RBP の摂取は ZDF ラットにおいて、糖尿病の進行を穏やかにする可能性が示された。

糖尿病性腎症の早期診断マーカーとして利用されている尿中アルブミン排泄は、C 群では 4 週目以降著しい上昇がみられたが REP, RBP 群ではその上昇が有意に抑制されていた ($P < 0.05$, 図 2)。以上の結果より、REP, RBP の摂取は ZDF ラットの糖尿病性腎症の進行を有意に抑制させることが明らかとなった。

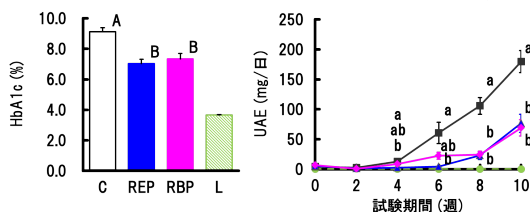


図2 米胚乳・米糠タンパク質の摂取が糖尿病および糖尿病性腎症に与える影響
C, カゼイン; L, 非糖尿病ラット; RBP, 米糠タンパク質; REP, 米胚乳タンパク質; UAE, Urinary albumin excretion. ^{a,b}, $P < 0.05$; ^{A,B}, $P < 0.01$.

ミネラル代謝に与える影響

P や Ca など血中のミネラル濃度は骨、腎臓、小腸などさまざまな臓器の働きにより、一定の範囲内に収まるように厳密に調節されている。このミネラルの恒常性が崩れると、血管の石灰化を招き、心血管疾患のリスクを増

大させることが知られている。このようなミネラル代謝異常を招く原因の 1 つに慢性腎疾患による腎機能の低下が挙げられる。そこで本研究では、初めに REP, RBP 摂取がミネラル代謝異常に与える影響を評価するために、血中 P, Ca 濃度、これらミネラル濃度の調節に関わる重要な因子である血中 Fibroblast growth factor (FGF) 23, 副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度の測定を行った。

その結果、血中 P, Ca 濃度に有意な変動がみられず、REP, RBP 摂取は血中 P, Ca 濃度に影響を及ぼさない可能性も考えられた。一般に血中 P, Ca 濃度に異常な変動がみられるのは、腎疾患の病態がかなり進行した状況からであり、本研究の試験条件ではそこまで慢性腎疾患が進行しておらず、全てグループで血中 P および Ca の恒常性が維持されている状況であった可能性が推察された。

一方、骨から分泌され、血中 P 濃度低下作用を有し、慢性腎疾患の進行に伴い最も早く血中濃度が上昇することが知られている FGF23 は、C 群と比較して REP, RBP 群で有意に低値を示した。なお FGF23 の上昇抑制作用は RBP と比較して、REP 群でより顕著であった ($P < 0.05$)。また、血中 Ca 濃度を上昇させる作用を有し、FGF23 の間接的な作用により血中レベルが上昇することが知られている PTH は、有意な変動こそみられなかったものの REP, RBP 群で低下する傾向がみられた (図 3)。以上の結果より、REP, RBP はミネラル代謝異常の進行を穏やかにする作用を有している可能性が示された (図 3)。

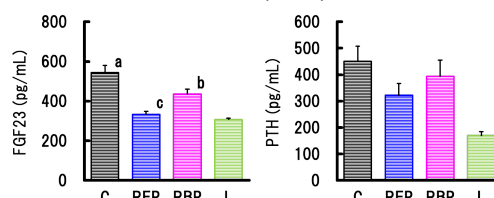


図3 米胚乳・米糠タンパク質の摂取がミネラル代謝に与える影響
C, カゼイン; FGF23, L, 非糖尿病ラット; PTH, 副甲状腺ホルモン; RBP, 米糠タンパク質; REP, 米胚乳タンパク質. ^{a,b,c}, $P < 0.05$.

骨に与える影響

CKD-MBD は腎機能の低下によりミネラル代謝異常を引き起こすだけではなく、骨代謝にも異常をきたし、骨折のリスクを増大させることが知られている。また糖尿病自体も高血糖による酸化ストレスが骨の脆弱化に影響すると考えられており、糖尿病は高血糖および腎機能の低下という 2 つの因子により、骨の脆弱化をより引き起こしやすい疾病であるといえる。そこで本研究では、REP, RBP の摂取が ZDF ラットの骨代謝に与える影響を検討することとした。まず初めに、血中の骨代謝マーカーに対する影響を評価した。オステオカルシン (OC) は主に骨芽細胞から分泌されるタンパク質であり、血中の骨形成マーカーとして利用されている。この OC の発現は高血糖により低下することが報告されているが、ZDF ラットでは非糖尿病ラットと比較

して低値を示すことが明らかとなった。また、C群と比較してREP、RBP群では有意に高値を示し、骨形成の低下が抑制されている可能性が示された。このようなOCの低下抑制作用は、REP、RBP摂取による血糖値上昇の抑制作用を介している可能性が推察された。一方、TRAPは破骨細胞などに存在する酵素であり、骨吸収の亢進などにより血中に漏出することが知られ、骨吸収のマーカーとして利用されている。このTRAPはRBP群では変動がみられなかったものの、C群と比較してREP群で有意に高値を示した。以上の結果より、Cと比較してREPは骨形成、骨吸収を増加させ骨の代謝回転を亢進し、RBPは骨形成を増加させている可能性が推察された。

次に骨に対する影響を評価した。大腿骨長に有意な変動はみられなかったものの、大腿骨重量ではC群と比較して、REP、RBP群で有意に高値を示した ($P < 0.05$)。このような大腿骨重量の増加は、先に述べた骨形成マーカーの上昇と一致する結果であった。また μ CTによる骨微細構造の形態観察の結果より、皮質骨においてC群と比較して、REP、RBP群で皮質骨体積 (CV) の有意な上昇がみられ ($P < 0.01$, 図4), 皮質骨の微細構造が改善している可能性が示された。一方海綿骨では、C群と比較してREP、RBP群でBone volume (BV) /Tissue volume (TV) の改善がみられただけでなく、骨梁の微細構造 (骨梁数, 骨梁幅, 骨梁間隙) の劣化を有意に改善していることが示された ($P < 0.05$, 図4)。また、その改善作用はRBP群でより顕著であった。骨梁の構造が理想的なものであるかを判断する指標の1つとしてStructure model index (SMI) がある。SMIは、理想的な板状の場合は0, 棒状の場合は3となる指標であり、REP、RBP摂取によりSMIが有意に低値を示し、より理想的な骨梁構造を有していることが示された。以上の結果よりREP、RBPの摂取はCKD-MBD

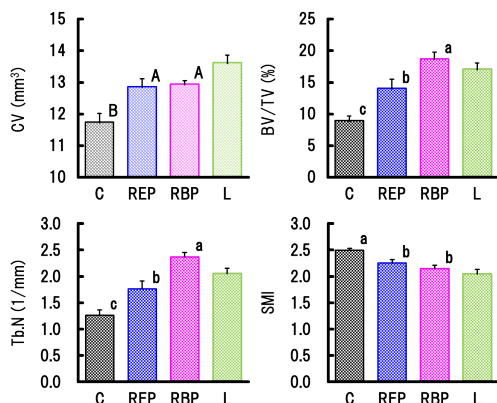


図4 米胚乳・米糠タンパク質の摂取が骨微細構造に与える影響
BV/TV, Bone volume/Tissue volume; C, カゼイン; CV, Cortical bone volume; L, 非糖尿病ラット; RBP, 米糠タンパク質; REP, 米胚乳タンパク質; SMI, Structure model index; Tb.N: Trabecular number. * $P < 0.05$; ^{A,B}, $P < 0.01$.

による骨微細構造の劣化を抑制することが明らかとなった。

このような骨微細構造の改善が骨強度の改善に繋がっているかを評価するために、3点曲げ試験を行い、骨強度を評価した。その

結果、C群と比較してREP、RBP群で最大荷重、Stiffnessが有意に高値を示し ($P < 0.01$, $P < 0.05$, 図5), REPおよびRBPの摂取が糖尿病モデルラットにおける骨強度の劣化を抑制している可能性が示された。

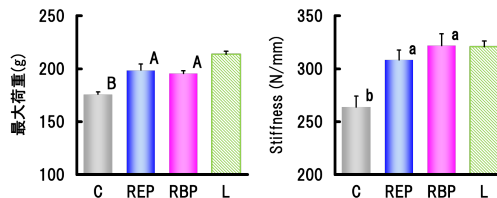


図5 米胚乳・米糠タンパク質の摂取が骨強度に与える影響
C, カゼイン; L, 非糖尿病ラット; RBP, 米糠タンパク質; REP, 米胚乳タンパク質. * $P < 0.05$; ^{A,B}, $P < 0.01$.

本研究により、REP、RBPが糖尿病および糖尿病性腎症の進行を遅延させ、CKD-MBDの進行を遅延させる機能を有していることが明らかとなった。糖尿病は患者数の増加が大きな問題となっている疾病であり、現在の日本の透析の状況を考えると、糖尿病や糖尿病性腎症などを原因疾患とするCKD-MBDの患者数は今後ますます増えることが容易に想像される。このような状況を考慮すると、糖尿病モデル動物を用いた本研究の成果は大きなインパクトを与えるものと考えられる。しかし本研究の検討では、REP、RBPの有益な効果は確認できたものの、その作用メカニズムを解明するまでには至らなかった。REP、RBPが糖尿病や糖尿病性腎症の進行を抑制する作用を有していることが明らかになったことから、原因疾患の進行抑制を介したCKD-MBDの進行遅延作用というメカニズムが容易に想像できるが、これだけで全てのメカニズムを説明することは困難であると考えている。実際、糖尿病や糖尿病性腎症に対する影響に明確な差はみられないにもかかわらず、骨関連の一部のパラメータはRBPでより顕著な影響がみられており、骨に対する直接的な作用メカニズムの存在も推察される。今後は、骨芽細胞や破骨細胞などの培養細胞系を用いた検討により、骨に対する直接的な影響を評価していく必要があると考えている。

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1件)

Kubota M, Watanabe R, Kadowaki M 他5名(8名中1番目), Rice endosperm protein slows progression of fatty liver and diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Nutr*, 116, 1326-1335, 2016, 査読有.

〔学会発表〕(計5件)

菅木省吾, 小森絵里香, 久保田真敏, 他
8名, 2型糖尿病モデルZDFラットの骨・
ミネラル代謝異常に対する米糠タンパク
質の有効性, 日本農芸化学会2017年度大
会, 京都女子大学, 2017年3月17日~
20日.

Kubota M, Yamaguchi M, Watanabe R, *et al.*, Rice bran protein has beneficial effects on diabetes, fatty liver and diabetic nephropathy. The 3rd International Congress on Rice Bran Oil, Tokyo, Japan, October, 24-25, 2016.

Sugaki S, Komori E, Kubota M, *et al.*, Rice bran protein has beneficial effects on chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) in type 2 diabetic ZDF rats. The 3rd International Congress on Rice Bran Oil, Tokyo, Japan, October, 24-25, 2016.

久保田真敏, 渡邊令子, 熊谷武久, 他2
名, 米胚乳タンパク質の特性と糖尿病合
併症に対する有効性, シンポジウム9「米
の新しい健康機能の発見」, 第70回日本
栄養・食糧学会大会, 武庫川女子大学,
2016年5月13日~15日.

Sugaki S, Komori E, Kubota M, *et al.*, Effect of rice bran protein on chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) in type 2 diabetic ZDF rats. 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, May, 14-18, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 真敏 (Kubota Masatoshi)
新潟大学 研究推進機構 超域学術院
助教
研究者番号: 00595879