

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11671

研究課題名(和文)慢性腎臓病(CKD)に伴う心血管疾患の発症予防とアルブミン酸化還元動態の制御

研究課題名(英文)Prevention of cardiovascular disease associated with chronic kidney disease (CKD) and regulation of plasma albumin redox state

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)患者のタンパク質制限療法では、食事タンパク質の摂取量に関する基準は提示されているが、食事タンパク質の質に関する検討は少ないと思われる。本研究では、CKDモデルラットにタンパク質源が異なる低タンパク質食を給仕したところ、血漿酸化型アルブミン比率に差が生じることを見いだした。今後、酸化型アルブミン比率の上昇を抑制する効果的な食事療法を提案することができるかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者数1,330万人に及ぶ慢性腎臓病(CKD)の患者は、重症化とともに心血管疾患合併症の発症リスクが高く、その発症はCKD患者における死亡原因の第1位である。病態の重症化や合併症の発症に対し、血漿タンパク質の1つであるアルブミン分子の酸化修飾が影響を及ぼす可能性がこれまでに報告されていた。本研究成果は、このアルブミンの酸化を食事療法によって軽減できる可能性を示唆する重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：In protein restriction therapy for patients with chronic kidney disease (CKD), standards for dietary protein intake have been proposed, but there appear to be few studies on the quality of dietary protein. In this study, we found that CKD rats fed a low-protein diet with different protein sources showed differential plasma oxidized albumin ratios. In the future, it may be possible to suggest an effective dietary therapy that attenuates the elevated oxidized albumin ratio.

研究分野：栄養科学

キーワード：CKDモデルラット アデニン 血漿アルブミン酸化還元型比率

1. 研究開始当初の背景

現在、成人人口の13% (1,330万人) にのぼるとされる慢性腎臓病 (CKD) 患者では、心血管疾患を合併症として発症するリスクが高い。CKD では様々な因子が関与して、血管内皮機能障害、血管石灰化を生じ、動脈硬化、心血管疾患の発症につながるものと考えられる。さらに近年では、サルコペニアが CKD 患者における心血管疾患発症のリスク因子であることも報告された。一方、CKD 患者の食事療法では、腎臓保護を目的としたタンパク質制限療法が実施される。タンパク質摂取不足の状態では、筋量低下が容易に生じることから、栄養管理の大きな課題といえる。また、骨格筋量と同様にタンパク質栄養状態の評価指標として血漿アルブミン濃度が利用されている。CKD 患者でも死亡率と低アルブミン血症の関連は古くから報告されてきた。さらにアルブミン分子の構造に着目すると、34 残基目に存在するシステイン残基 (Cys34) の SH 基がフリーの状態は還元型、S-S 結合を介して小分子の結合した状態は酸化型と大別されるが、CKD 患者では還元型アルブミン比率が腎機能低下に依存して低下していること、このアルブミン酸化還元動態の変化が重症化や死亡率と関連することが報告されている。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、タンパク質摂取量の低下が健常ラットの血漿アルブミン還元型比率を低下させること、そしてその還元型比率低下の程度は、食事タンパク質源 (食事タンパク質のアミノ酸組成) によって異なることを報告してきた。CKD 患者に対するタンパク質制限療法は、食事療法自体が血漿アルブミンの還元型比率の低下、酸化型比率の上昇をまねき、腎機能低下をはじめ、合併症としての心血管疾患の発症に影響を及ぼす可能性も考えられる。

そこで本研究では、CKD モデルラットにタンパク質源の異なる低タンパク質食を給餌し、血漿アルブミンの酸化還元動態、腎機能、血管の石灰化等に及ぼす影響を検討した。CKD に対する現在のタンパク質制限療法は、腎臓への負荷を軽減することを目的とした保存療法的な食事療法として位置づけられ、食事タンパク質の摂取量に関する基準は提示されているが、食事タンパク質の内容に関する検討は乏しいと思われる。本研究は、タンパク質源の異なる低タンパク質食給餌下における血漿アルブミンの酸化還元動態を指標とし、より効果的な食事療法を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

9 週齢の Wistar/ST 系雄性ラット (体重約 270~290 g) を恒温 (22±2°C)、12 時間の明暗サイクル (8:00~20:00 点灯) の条件下で飼育し、アデニン含有飼料を摂取させることで、CKD モデルラットを作製した。

まず、0.25%アデニンを添加した 20%カゼイン食を 2 週間給餌したのち、体重、摂餌量、血漿クレアチニン濃度より 4 群に分け、0.1%アデニンを添加したそれぞれの実験食を 15 週間給餌した。実験食は、5%カゼイン食、0.136%リシンを添加した 5%カゼイン食、6%小麦グルテン食、そして 0.136%リシンを添加した 6%小麦グルテン食とし、各飼料を摂取した実験群を CA 群 (n=5)、CA+Lys 群 (n=5)、WG 群 (n=5) 及び WG+Lys 群 (n=5) とした。なお、カゼインと小麦グルテン中の窒素含有量が等しくなるように飼料を調整するとともに、小麦グルテンの第一制限アミノ酸であるリシンを添加した飼料も準備した。

飼育期間中は定期的に尾静脈から採血して血漿を得た。さらに 24 時間尿も採取した。15 週間の実験飼育終了後はイソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血し、脱血させ、安楽死させた。その後、腎臓、心臓、胸部大動脈、骨格筋を摘出した。採取した血液の一部は血液細胞の Total RNA 抽出に用い、残りの血液からは血漿を得た。得られた血漿と尿サンプル、摘出臓器等は、使用するまで -80°C で保存した。

(2) 生化学検査と血漿アルブミン酸化還元型比率の分析

血液生化学検査、尿検査は自動臨床化学分析装置 (DRI-CHEM4000i, FUJIFILM)、あるいは各測定キットを用いて測定した。

血漿アルブミン酸化還元型比率は、Shodex-Asahipak ES-502N-7C カラムを接続した High-performance liquid chromatography (HPLC) を用いて分析し、分離した血漿サンプルの曲線下面積比で算出した。

(3) 遺伝子発現量およびタンパク質発現量の解析と組織学検討

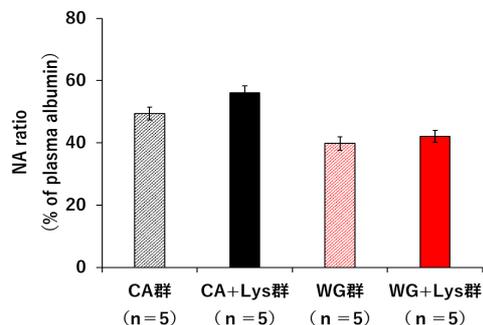
血液細胞、腎臓および心臓から Total RNA を抽出し、cDNA を合成した。リアルタイム PCR を実施し、炎症性サイトカインの遺伝子発現量を検討した。また、腎臓タンパク質画分における α -smooth muscle actin (SMA) 発現量、および心臓タンパク質画分における endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 発現量をウエスタンブロット法で解析した。

組織学的な検討として、腎臓の線維化を検討する目的でマッソントリクローム染色を、血管の石灰化を検討する目的でフォンコッサ染色をおこなった。

4. 研究成果

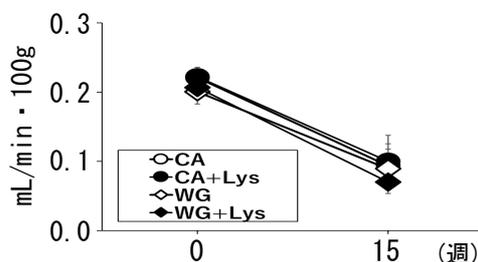
摂餌量は、リシンを添加したそれぞれの群が無添加の群より有意に多かったが、体重には有意な差は認められなかった。しかしながら WG 群と比較して、WG+Lys 群の体重は高値傾向を示した (307.2±7.9 g vs 330.7±7.9 g)。

血漿アルブミン濃度にも有意な差は認められなかったが、血漿酸化型アルブミン比率 (Nonmercaptalbumin (NA) ratio) に関しては、交互作用は認められなかったものの、食事タンパク質源の違いにより有意な差が認められた。すなわち小麦グルテンをタンパク質源とした 2 群の酸化型アルブミン比率は、カゼインをタンパク質源とした 2 群よりも有意に低値を示した。健常ラットではシスチン摂取量が血漿酸化型アルブミン比率の上昇抑制に重要となる可能性を既に報告している。今回の結果は、カゼインよりも約 4 倍シスチン含量が多い小麦グルテンの摂取は、CKD モデルラットにおいても血漿酸化型アルブミン比率の上昇を軽減できる可能性が見出された。



一方、血漿カルシウム濃度、血漿リン濃度、尿中カルシウム濃度および尿中リン濃度は、4 群間に有意な差は認められなかった。また、血液細胞における Interleukin (IL) -1 β 、IL-6 および Tumor Necrosis Factor (TNF) - α の mRNA 発現量も、4 群間で有意な差は認められなかった。

腎機能の指標としてクレアチンクリアランスを検討したところ、実験飼育開始時と比較して、全ての群でクレアチンクリアランスの低下は確認されたが、4 群間に有意な差は認められなかった。保存期腎不全患者において、血漿酸化型アルブミン比率の上昇は推定糸球体濾過量 (estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR)) の低下と関連することが報告されていることから、今後は飼育期間の異なる時期にもこれら両因子の関連について検討すべきかもしれない。



一方、腎臓における炎症性サイトカインの遺伝子発現量を検討したところ、IL-1 β mRNA 発現量が CA+Lys 群でのみ有意に高値を示した。詳細な発現誘導機構は明らかではないが、血漿酸化型アルブミン比率も CA+Lys 群が最も高い値を示していたことから、今後、これらの関連についても検討すべきかもしれない。腎臓における α -SMA 発現量やマツソントリクローム染色像には 4 群間で差は認められなかった。また、心臓における炎症性サイトカイン遺伝子発現量、eNOS 発現量や胸部大動脈のフォンコッサ染色像も同様、4 群間に差は認められなかった。

本研究の結果、CKD モデルラットの摂取タンパク質の質が血漿アルブミンの酸化還元動態に影響を及ぼすことが示された。CKD 患者や透析患者では、血漿酸化型アルブミン比率と病態の進行度や予後との関連が示唆されているが、これには患者の食事内容も影響を及ぼす可能性が考えられる。実験条件をあらためて検討し、食事内容を反映した血漿アルブミン酸化還元動態と腎機能や合併症発症との関連をさらに検討すべきであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kaji Ayumi, Hashimoto Yoshitaka, Kobayashi Yukiko, Wada Sayori, Kuwahata Masashi, Yamazaki Masahiro, Fukui Michiaki	4. 巻 35
2. 論文標題 Protein intake is not associated with progression of diabetic kidney disease in patients without macroalbuminuria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes/Metabolism Research and Reviews	6. 最初と最後の頁 e3150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dmrr.3150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 桑波田雅士	4. 巻 35
2. 論文標題 アミノ酸栄養と血漿アルブミン酸化還元動態	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 体液・代謝管理	6. 最初と最後の頁 22-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yano Yukimi, Maeda Chihiro, Kaneko Ichiro, Kobayashi Yukiko, Aoi Wataru, Kuwahata Masashi	4. 巻 69
2. 論文標題 Cystine supplementation sustains plasma mercaptalbumin levels in rats fed low-protein diets more effectively than methionine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 122 ~ 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.20-146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kobayashi K, Wada A, Nakamura M, Kuroda A, Kido S, Harada D, Kuwahata M.
2. 発表標題 Influence of postoperative infusion of amino acids and exogenous albumin on albumin synthesis in surgically stressed rats
3. 学会等名 2020 ESPEN Virtual Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑波田雅士
2. 発表標題 血漿アルブミン酸化還元動態とタンパク質栄養
3. 学会等名 第42回日本栄養アセスメント研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yano Y, Kuwahata M.
2. 発表標題 Effect of amino acid composition of dietary protein on redox state of plasma albumin in rats fed low-protein diets.
3. 学会等名 Asian Congress of Nutrition 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田千尋、小林由紀子、青井渉、桑波田雅士
2. 発表標題 慢性腎臓病モデルラットにおける小麦グルテン低タンパク質食の摂取が血漿アルブミン酸化還元動態と腎機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------