

機関番号：24302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700763

研究課題名（和文） 蛋白質・エネルギー低栄養状態が脳内環境に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effect of protein-energy malnutrition on brain function.

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・准教授

研究者番号：30304512

研究成果の概要（和文）：蛋白質・エネルギー低栄養状態においては、血漿アルブミン濃度の低下とともに、肝臓および脳におけるアルブミン遺伝子発現量が減少すること、ならびに血漿中の酸化型アルブミン比率が増大することを見出した。アルブミンは脳脊髄液中にも存在しており、酸化型アルブミンの存在は脳機能にも影響を及ぼす可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Hypoalbuminemia was observed in plasma of rats with malnutrition. Levels of albumin mRNA were decreased in both liver and brain of rats with malnutrition. Furthermore, percentage of oxidized albumin within total plasma albumin increased in rats with malnutrition. Albumin is also found in cerebrospinal fluid. The increase of oxidized albumin may influence the brain function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：栄養科学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：低栄養状態、アルブミン、酸化型アルブミン

1. 研究開始当初の背景

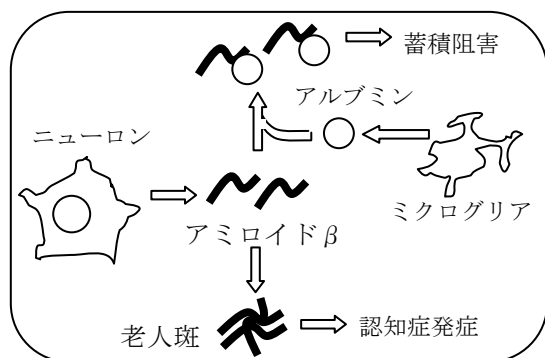
10年後の我が国は、高齢者率（65歳以上の高齢者が全人口に占める割合）が25%を占める超高齢化社会を迎えると予想されている。高齢者は食事摂取量の不足や摂取栄養素の偏りなどから容易に蛋白質・エネルギー低栄養状態（protein-energy malnutrition: PEM）に陥ることが知られており、免疫能の低下に起因する感染症をはじめ、高齢者に特徴的な疾病の発症に大きな影響を及ぼしている。

高齢者人口の増加に伴う社会問題の1つに認知症患者数の増大があげられ、国内の疫学調査の結果では、老人人口の約10%が認知症

を発症しているとの報告もなされている。我が国では現在、病気の進行過程を明確に示す客観的な評価法を確立することを目的に、健常高齢者と軽度認知障害や初期段階のアルツハイマー病を発症している患者を対象とし、脳画像や血液・尿などを定期的に検査する追跡調査（J-ADNI (Japan Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative)）が全国レベルで実施されている。

アルブミンは、血漿タンパク質の約60%を占めている分泌性タンパク質であり、世界的に栄養リスクマーカーとして利用されている。近年の研究から、低濃度ではあるが脳脊

髄液中にも総タンパク質の約 80%もの割合でアルブミンが存在しており、アルツハイマー型認知症の原因の1つと考えられているアミロイドβの重合反応を抑制している可能性が示唆された。



さらに脳内のアルブミンは、肝臓で合成された分子が血液脳関門を通り抜けて移入していると考えられているが、最近の研究では、脳に存在するミクログリア細胞がアルブミン合成能を有する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

肝臓におけるアルブミン合成調節機構は、栄養状態の影響を強く反映する。PEM では、アルブミン合成活性の低下に伴い、血漿アルブミン濃度が顕著に低下することが知られている。

本研究では、PEM モデルラットを作製し、低栄養状態が脳内アルブミン代謝に及ぼす影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PEM モデルラットの作製

動物実験は、全て学内の委員会の承認を受けて実施した。

① 食餌性低栄養モデルラット

5%カゼイン食で1ヶ月間維持することで、PEM モデルラットを作製する。対照群には20%カゼイン食を給餌する。通常の20%カゼイン食で飼育した場合と比較して、5%カゼイン食では食餌摂取量が明らかに低下することから、蛋白質摂取量とともにエネルギー摂取量も不足し、PEM の特徴である低アルブミン血症や骨格筋量の減少が認められる。飼育期間中は食餌摂取量および体重を記録し、また経時的に尾静脈採血を実施して血液生化学検査をおこなった。

② 慢性肝障害モデルラット

肝臓疾患時には高頻度にPEMが認められる。PEM に対する栄養療法として、分岐鎖アミノ酸 (Branched-chain amino acids: BCAA) 補充療法が広く施行されており、低アルブミン血症を含めた低栄養状態の改善に有用とさ

れている。

本実験では50%四塩化炭素 (CCl₄) 溶液 (CCl₄・オリーブ油混合液) を週2回皮下投与することで慢性肝障害モデルラットを作製した。11週間ラットを飼育することで慢性肝障害に伴うPEMを誘発する。飼料として、20%カゼイン食あるいは17.5%カゼイン・2.5%BCAA (バリン:ロイシン:イソロイシン=1.2:2:1) 食を与えた。飼育期間中は食餌摂取量および体重を記録し、また経時的に尾静脈採血を実施して血液生化学検査をおこなった。

(2) アルブミン遺伝子発現量の検討

ラット肝臓あるいは脳から、Total RNA を抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成した。アルブミン特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCRにより、アルブミン遺伝子発現量 (mRNA量) を検討した。

(3) ウェスタンブロット解析

ラット肝臓よりタンパク質画分を抽出し、電気泳動で分離後、フィルターに電氣的に転写した。フィルターを抗S6K1抗体および抗リン酸化特異的S6K1抗体とインキュベートしたのち、蛍光発色させることで、タンパク質リン酸化の程度を検討した。

(4) 血漿アルブミン酸化還元動態の検討

ラットの血液から分離した血漿をイオン交換カラム Shodex-Asahipak ES-502N-7C を利用した高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) で分離し、血漿アルブミン分子の酸化還元動態について検討した。

4. 研究成果

(1) 食餌性低栄養モデルラットの肝臓および脳アルブミン遺伝子発現量の検討

5%カゼイン食で維持したラットは、対照食で維持したラットと比較して、食餌摂取量が減少し、体重増加も少なかった。さらに血漿総タンパク質濃度、アルブミン濃度の有意な低下が認められ、PEMにあると考えられた。

肝臓におけるアルブミン mRNA 量について検討したところ、対照と比較して5%カゼイン食で維持したラットで有意な減少が認められた。さらに脳におけるアルブミン mRNA 量を検討したところ、肝臓での発現調節同様、5%カゼイン食摂取により減少する傾向が認められた。

これらの結果から、栄養状態は、肝臓同様、脳におけるアルブミン合成に影響を及ぼす可能性が示唆された。すなわち低栄養に伴う脳内アルブミン合成の低下が、アミロイドβ

の蓄積を促進し、アルツハイマー型認知症の発症を促す可能性も示唆された。一方、脳脊髄液中に含まれるアルブミン分子の量は非常にわずかであり、またその多くは血液中のアルブミンが血液脳関門を介して移入していると考えられており、脳内におけるアルブミン合成の生理的重要性については、いまだ明らかとは言えない。今後、脳内に存在するアルブミンの量的な評価よりむしろ、アルブミン分子の質的評価が、脳機能に及ぼす影響を考えるうえで、重要な課題となるかもしれない。

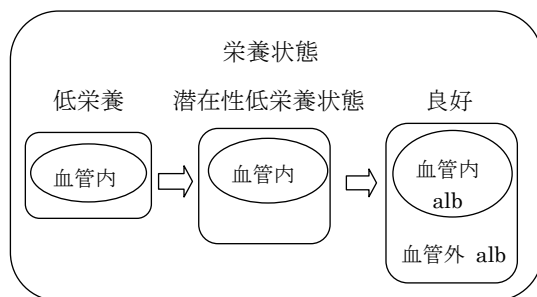
(2) 慢性肝障害モデルラットのアルブミン合成ならびに血漿アルブミンの酸化還元動態についての検討

健常ラットと比較して、CCl₄投与により作製した慢性肝障害モデルラットの血漿アルブミン濃度は有意に低値を示し、PEMにあることを確認した。肝障害を誘発するための飼育期間中、ラットは2群に分け、対照飼料あるいはBCAA添加飼料で維持したが、病態進行の指標となる血漿中トランスアミナーゼ活性およびアルブミン濃度に有意な差は認められなかった。さらに肝臓におけるアルブミンmRNA量についての検討もおこなったが、2群間に差は認められなかった。

肝臓疾患時のBCAA補充栄養療法では、タンパク質合成の調節に関与することが知られている mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルの活性化を介してアルブミン合成を促進し、低アルブミン血症を是正すると考えられている。そこで両群の肝臓における mTOR シグナルの活性化について、下流分子である S6K1 のリン酸化により検討した。対照群と比較して、BCAA 群では有意なリン酸化の上昇が検出されたことから、mTOR シグナルの活性化が生じている可能性が示唆された。

mTOR シグナルの活性化に伴うアルブミン合成の促進が予想されるにもかかわらず、血漿アルブミン濃度に差が認められなかった理由として、アルブミン分子の局在調節の関与が考えられた。

生体内のアルブミンはその約 50%が血管内、残り約 50%が血管外（細胞内）に存在することが知られている。新規合成されたアルブミ



ン分子は血管内と血管外に同程度の割合で分配されることから、低アルブミン血症が改善されるためには長時間を要すると言われている。さらに、肝臓におけるアルブミン合成が低下した場合には、血液中のアルブミン分子の半減期が延び、安定化されることが知られている。すなわち、低栄養状態において血漿中に存在するアルブミンは、合成されてから時間の経過した古いアルブミンが多く存在していると予想される。

アルブミンの質的評価を検討する目的で酸化還元状態を検討したところ、対照群と比較して、BCAA 群では酸化型アルブミン比率の減少および還元型アルブミン比率の上昇が認められた。この結果は、アルブミン濃度に差が認められない状態でも、アルブミン分子の質的評価が重要であることを示している。

PEM では低アルブミン血症ばかりでなく、アルブミン分子の酸化型比率が増大している可能性が示唆される。PEM において酸化型アルブミンが脳内に多く移行していると仮定すると、神経細胞に酸化障害を誘導する可能性が示唆される。すなわち、低栄養状態がアルブミン分子の酸化還元動態を介して脳機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。今後、PEM における脳脊髄液中のアルブミン分子酸化還元動態について検討することが重要であろう。

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 Kuwahata, M., Kubota, H., and Kido, Y. et al. (他 5 名、1 番目) Effect of branched-chain amino acid supplementation on the oxidized/reduced state of plasma albumin in rats with chronic liver disease. J. Clin. Biochem. Nutr. 査読有、印刷中
- ② 桑波田雅士 栄養状態によるアルブミン合成の調節機構に関する研究、日本栄養・食糧学会誌、査読有、印刷中
- ③ Kuwahata, M., Kubota, H., and Kido, Y. et al. (他 7 名、1 番目) Dietary medium-chain triglycerides attenuate hepatic lipid deposition in growing rats with protein malnutrition. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 査読有、Vol. 57, 2011, 138-143

[学会発表] (計 6 件)

- ① 桑波田雅士 (他 3 名) BCAA 補充栄養療法が慢性肝障害モデルラットのアルブ

ミン酸化還元動態に及ぼす影響、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 15 日、お茶の水女子大学（東京）

- ② 久保田紘代、桑波田雅士（他 2 名）慢性肝疾患モデルラットの肝障害進行に対する BCAA 補充栄養療法の有用性、第 14 回日本病態栄養学会年次学術集会、2011 年 1 月 16 日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ③ 桑波田雅士 栄養状態によるアルブミン合成の調節機構に関する研究、第 64 回日本栄養・食糧学会大会、2010 年 5 月 21 日、アスティとくしま（徳島）

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/nutrition_sci/

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・
准教授

研究者番号：30304512