

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：47701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350873

研究課題名(和文)科学的根拠に基づく新規糖尿病網膜症栄養指導法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel nutritional treatment for diabetic retinopathy based on scientific evidence.

研究代表者

有村 恵美 (ARIMURA, EMI)

鹿児島県立短期大学・その他部局等・助教

研究者番号：40552964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症の薬物療法においてレニン-アンジオテンシン系(RAS)の抑制効果が報告されている。われわれは、正常マウスにおいて、低たんぱく食がRAS系遺伝子発現を抑制することを示した。低たんぱく食は、腎臓だけではなく網膜にも有効ではないかと考え、食事たんぱく質が2型糖尿病網膜症へ及ぼす影響について検討した。

その結果、同じエネルギー量・脂質量下において、食事たんぱく質が網膜遺伝子発現に影響を及ぼすことが示された。このことがどのような病態生理的な意義があるのかは、さらなる検討が必要だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：There have been several reports that diabetic retinopathy is treated by inhibitors of renin-angiotensin system (RAS). We previously showed that low-protein diet suppressed expression of RAS related genes in control mice. Then, we thought the possibility that the low-protein diet was effective for not only the kidney but also the retina. We examined how dietary protein contents affect diabetic retinopathy caused by type 2 diabetes. As a result, under the same content of energy and fat, dietary protein content affected expression of the genes related to RAS, astrocyte and microglia. Further examination is necessary to explain the pathophysiological meanings of the alterations of the gene expression.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：栄養指導 食事療法 糖尿病 糖尿病網膜症 食事たんぱく質 動物モデル 遺伝子発現 レプチン受容体

1. 研究開始当初の背景

糖尿病治療薬は進歩しているにもかかわらず、糖尿病合併症患者（網膜症、腎症、神経障害）は増加している。日本人の食生活変化（炭水化物減少、植物性たんぱく質減少、食物繊維総量減少、動物性たんぱく質増加、脂質量増加）が糖尿病増加の一要因と言われているにもかかわらず、糖尿病の食事療法は、炭水化物を抑えるあまり高たんぱく食となっている。初期の高たんぱく食が、糖尿病腎症増加の一要因と考えて、臨床研究し、その可能性を報告した。臨床例の検討では、詳細な分析は困難なため、2型糖尿病モデルマウスで検討し、低たんぱく高炭水化物食のほうが、高たんぱく低炭水化物食より腎機能だけではなく糖代謝にも有効であることを報告した。同報告で、正常マウスにおいて、低たんぱく高炭水化物食のほうが、高たんぱく低炭水化物食より腎臓の RAS 系遺伝子発現を抑制することを報告した。糖尿病網膜症全病期に対して、糖尿病食事療法が行われているが、網膜症に対する効果機序は不明である。一方、網膜症患者ではレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の亢進が認められることから、その抑制には RAS 阻害剤が臨床的に用いられている。このことから、網膜症に対しても低たんぱく高炭水化物食のほうが、高たんぱく低炭水化物食より有効なのではないかと考え試みた。

2. 研究の目的

科学的根拠に基づく新規糖尿病網膜症栄養指導法の開発

- (1) 現在の糖尿病食事療法・栄養指導が適切かどうか。
- (2) 同じエネルギー量、同じ脂質量下で、低たんぱく高炭水化物食と高たんぱく低炭水化物食の網膜へ及ぼす影響。
- (3) 血糖に差がない条件下で、食事たんぱく質が 2 型糖尿病網膜症における遺伝子発現に及ぼす影響。

3. 研究の方法

4 週齢雄性の 2 型糖尿病モデルマウス (diabetic mice: *db* マウス, n = 12) と野生型マウス (C マウス, n = 12) を日本クレアより購入し、1 週間馴らし飼育後、食事の中のたんぱく質エネルギー比率別の低たんぱく高炭水化物食 (L 食、たんぱく質エネルギー比率: 12%、脂質エネルギー比率: 17%、炭水化物エネルギー比率 71%)、高たんぱく低炭水化物食 (H 食、たんぱく質エネルギー比率: 24%、脂質エネルギー比率: 17%、炭水化物エネルギー比率 59%) で、C-L 群: 6 匹、*db*-L 群: 6 匹、C-H 群: 6 匹、*db*-H 群: 6 匹の異なる食事にて 6 週間飼育した。実験中、*db* 群はペアフェッド、自由摂水とし、C 群は自由摂食、自由摂水とした。1 週間に 1 回、体重、摂食量、摂水量を 14:00-16:00 の間に測定した。10 週齢に、蛍光眼底造影検

査、光干渉断層計 (Optical Coherence Tomography: OCT) を行った。6 週間飼育後、11 週齢において、ネンブータル麻酔下で、EDTA を含んだシリンジにて心臓より採血し、頸椎脱臼にて安楽死させた。尿は麻酔前に採取し保存した。血液は遠心分離後、上清を保存した。臓器 (腎臓、肝臓、膵臓、心臓) を摘出し、重量測定後、液体窒素にて凍結し、-80°C で保存した。眼球は、麻酔下にて摘出、網膜を剥離した。網膜から RNA 抽出後 cDNA を調製した。3 種類の細胞と RAS について、リアルタイム PCR 法にて発現を評価した。本研究は、鹿児島大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

4. 研究成果

体重・摂水量は、*db* 群と C 群の比較では、H・L 食群いずれの群においても、*db* 群は C 群よりも有意に高値だった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間では有意差が認められなかった。

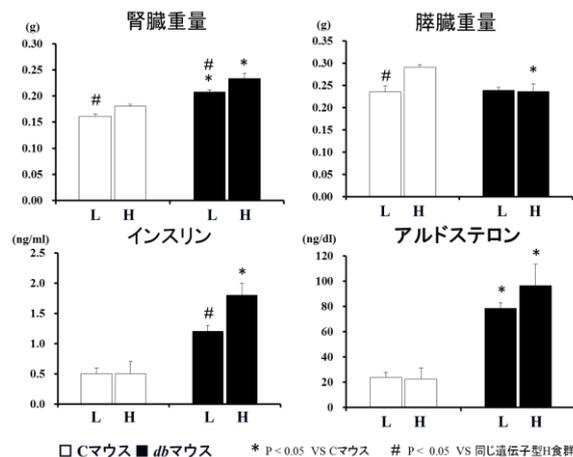
腎臓重量は、*db* 群と C 群の比較では、H・L 食群いずれの群においても、*db* 群は C 群よりも有意に高値だった。*db* 群、C 群のいずれも、L 食群のほうが H 食群よりも有意に低値を示した。

膵臓重量・肝臓重量は、*db* 群と C 群の比較では、H・L 食群いずれの群においても、*db* 群は C 群よりも有意に高値だった。*db* 群では有意差はなかったが、C-L 食群のほうが C-H 食群よりも有意に低値を示した。

心臓重量は、*db* 群と C 群の比較では、有意差は認められなかった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間では有意差が認められなかった。

Insulin は、*db* 群と C 群の比較では、*db*-H 群は C-H 群よりも有意に高値だった。C 群では有意差はなかったが、*db*-L 食群のほうが *db*-H 食群よりも有意に低値を示した。

Aldsterone は、*db* 群と C 群の比較では、H・L 食群いずれの群においても、*db* 群は C 群よりも有意に高値だった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間では有意差が認められなかったが、*db*-L 食群のほうが *db*-H 食群よりも低い傾向であった。



FBG は、*db* 群と C 群の比較では、H・L 食群いずれの群においても、*db* 群は C 群よりも有意に高値だった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間では有意差が認められなかった。

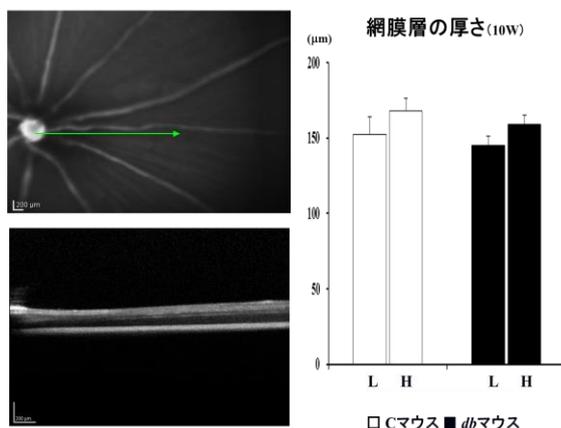
C-peptide は、*db* 群と C 群の比較では、H・L 食群いずれの群においても、*db* 群は C 群よりも有意に高値だった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間では有意差が認められなかった。

UG は、*db* 群と C 群の比較では、H・L 食群いずれの群においても、*db* 群は C 群よりも有意に高値だった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間では有意差が認められなかった。

蛍光眼底造影検査において、*db* 群と C 群の比較、*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間で形態学的に差が認められなかった。

網膜層の厚さは、*db* 群と C 群の比較では、有意差は認められなかった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間でも有意差が認められなかった。

光干渉断層計 (OCT: Optical Coherence Tomography)



網膜遺伝子については、*Gfap* は、*db* 群と C 群の比較では、*db*-H 群は C-H 群よりも有意に高値だった。*Cd11b* は、*db*-H 食群のほうが *db*-L 食群よりも高い傾向であった。*Aqp4* は、*db* 群と C 群の比較では、*db*-H 群は C-H 群よりも有意に低値だった。*db*-H 食群のほうが *db*-L 食群よりも発現が低い傾向であった。*Ace* は、*db* 群と C 群の比較では、*db*-H 群は C-H 群よりも有意に高値だった。*db* 群、C 群のいずれも、食事組成の異なる 2 群間では有意差が認められなかったが、*db*-H 食群のほうが *db*-L 食群よりも高い傾向であった。*Agt* は、*db* 群と C 群の比較では、有意差は認められなかった。*db*-L 食群のほうが *db*-H 食群よりも発現が有意に高かった。*Renin* においては、発現レベルが低く評価できなかった。

【考察】

同じエネルギー量・同じ脂質量下において、低たんぱく高炭水化物食の方が、高たんぱく低炭水化物食より腎臓保護・膵臓保護だけではなく、網膜症進展抑制に有効である可能性が示唆された。今後、さらなる検討が必要だと考えられる。

現在の糖尿病食事療法は、炭水化物を抑えるあまり高たんぱく食傾向であり、たんぱく質エネルギー比率 16-20% (糖尿病食品交換表) である。戦後の食生活の変化が、糖尿病増加の一要因と言われているが、より高たんぱく低炭水化物食となっている。

血糖と炭水化物との関係を検討したランダム化比較試験の解析によると糖尿病患者には、たんぱく質エネルギー比率 12-16% を推奨している。RAS 系阻害剤と食事療法 (エネルギー制限下でたんぱく質エネルギー比率を 12-16% へ抑えること) により、腎症発症進展抑制だけではなく、網膜症進展抑制にも繋がり、糖尿病患者の QOL 向上へ繋がるだけではなく、医療費削減にも寄与すると思われる。

眼科勤務の管理栄養士は非常に少なく、栄養食事指導もほとんど算定されていないのが現状である。眼科においても外科的な処置、薬物療法だけではなく、積極的な繰り返しの栄養食事指導が必要だと考えられる。

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 14 件)

1. Arimura E, Pulong WP, Marchianti AC, Nakakuma M, Abe M, Ushikai M, Horiuchi M, Deteriorated glucose metabolism with a high-protein, low-carbohydrate diet in *db* mice, an animal model of type 2 diabetes, might be caused by insufficient insulin secretion, *European Journal of Nutrition*, 査読有, (in press) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26497335>
2. Roussel J, Horiuchi M, 他(7 番目, 15 名), Carnitine deficiency induces a short QT syndrome, *Heart Rhythm*, 査読有, 13(1), 2016, 165-74 DOI:10.1016/j.hrthm
3. Horiuchi M, Nakakuma M, Arimura E, Ushikai M, Yoshida G, Experimental Approach to Analysis of the Relationship between Food Environments and Lifestyle-Related Diseases, Including Cardiac Hypertrophy, Fatty Liver, and Fatigue Symptoms, *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 査読有, 70, 2015, 110-114 DOI:10.1265/jjh.70.110

4. Daitoku S, Horiuchi M, 他(10 番目, 10 名), Angle between the common and internal carotid arteries detected by ultrasound is related to intima-media thickness among these with atherosclerotic disease, *Environ Health Prev Med*, 査読有, 20(3), 2015, 216-223 DOI:10.1007/s1299-015-0453-7
 5. Moriyama M, Horiuchi M, 他(22 番目, 25 名), Mechanism for increased hepatic glycerol synthesis in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse: Urine glycerol and glycerol 3-phosphate as potential diagnostic markers of human citrin deficiency, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1859(2), 2015, 1787-95 DOI:10.1016/j.bbadis
 6. Kobayashi S, Asakura K, Suga H, Sasaki S; Three-generation Study of Women on Diets and Health Study Groups. Inverse association between dietary habits with high total antioxidant capacity and prevalence of frailty among elderly Japanese women: a multicenter cross-sectional study, *J Nutr Health Aging*, 査読有, 18(9), 2014, 827-839 DOI:10.1007/s12603-014-0478-4
 7. Marchianti AC, Arimura E, Ushikai M, Horiuchi M, Voluntary exercise under a food restriction condition decreases blood branched-chain amino acid levels, in addition to improvement of glucose and lipid metabolism, in *db* mice, animal model of type 2 diabetes, *Environ Health Prev Med*, 査読有, 19(5), 2014, 339-347 DOI:10.1007/s12199-014-0400-z
 8. Miyahara E, Nishikawa T, Takeuchi T, Yasuda K, Okamoto Y, Kawano Y, Horiuchi M, Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1,2,4-benzenetriol, *Toxicology*, 査読有, 20(317), 2014, 50-7 DOI: 10.1016/j.tox.2014.01.007
 9. Akioka K, Kawaguchi H, Horiuchi M, 他(2,6 番目, 8 名), Investigation of necessity of sodium cholate and minimal required amount of cholesterol for dietary induction of atherosclerosis in microminipigs, *In vivo*, 査読有, 28(1), 2014, 81-90 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425840>
 10. Arimura E, Horiuchi M, Kawaguchi H, Miyoshi N, Aoyama K, Takeuchi T, Low-protein diet improves blood and urinary glucose levels and renal manifestations of diabetes in C57BLKS-*db/db* mice, *European Journal of Nutrition*, 査読有, 52(2), 2013, 813-824 DOI:10.1007/s00394-012-0387-4
 11. Kobayashi S, Asakura K, Suga H, Sasaki S; Three-generation Study of Women on Diets and Health Study Group. High protein intake is associated with low prevalence of frailty among old Japanese women: a multicenter cross-sectional study, *Nutrition J*, 査読有, 12, 2013, 164 DOI:10.1186/1475-2891-1-12-164
 12. Horiuchi M, 他(1 番目, 7 名), Ornithine ingestion improved sleep disturbances but was not associated with correction of blood tryptophan ratio in Japanese Antarctica expedition members during summer, *Nutr Res*, 査読有, 33(7), 2013, 557-564 DOI:10.1016/j.nutres
 13. Li JB, Horiuchi M, 他(15 番目, 17 名), Effects of aging on the plasma levels of nesfatin-1 and adiponectin, *Biomed Rep*, 査読有, 2(1), 2014, 152-156
 14. Haraguchi M, Horiuchi M, 他(8 番目, 11 名), Biochem Biophys Res Commun. 432(4), 2013, 618-625 DOI:10.1016/j.bbrc.2013.02.035.
- [学会発表] (計 13 件)
1. 有村恵美, 岡谷秀明, 荒木智陽, 川口博明, 中熊美和, 阿部正治, 牛飼美晴, 和泉博之, 堀内正久, 食事たんぱく質が2型糖尿病網膜症へ及ぼす影響, 第19回日本病態栄養学会学術集会, 2016年1月10日, パシフィコ横浜(神奈川県)
 2. Emi Arimura, Wijang Pralampita Pulong, Ancha Caesarina Novi Marchianti, Miwa Nakakuma, Masaharu Abe, Miharu Ushikai, Masahisa Horiuchi, Deteriorated glucose metabolism with a high-protein, low-carbohydrate diet in *db* mice, an animal model of type 2 diabetes, might be caused by insufficient insulin secretion, 7th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 21-22 November 2015, Hong Kong(China)
 3. 中野恵美子, Pulong Wijang Pralampita, 牛飼美晴, 有村恵美, 堀内正久, 糖尿病病態におけるアルコール長期摂取が臓器に及ぼす影響, 平成27年度日本産業衛生学会九州地方会学会, 2015年7月11日, 鹿児島県医師会館(鹿児島県)
 4. 有村恵美, 中熊美和, 阿部正治, 牛飼美晴,

- 堀内正久, 食事蛋白質量が2型糖尿病腎症発症・進展に及ぼす影響: マウスモデル確立と機序解明, 第3回日本腎不全栄養研究会学術集会・総会, 2015年7月5日, はまぎんホールヴィアマール(神奈川県)
5. 牛飼美晴, Ancah Caesarina Novi Marchianti, Pulong Wijang Pralampita, Li Qu, 上野真忠, 玉利千鶴, 有村恵美, 青山公治, 堀内正久, 糖尿病モデルマウスにおける運動負荷方法の違いがアミノ酸代謝に及ぼす, 第85回日本衛生学会学術総会, 2015年3月27日, 和歌山県民会館(和歌山県)
 6. 牛飼美晴, Ancah Caesarina Novi Marchianti, Pulong Wijang Pralampita, 中野恵美子, 有村恵美, 堀内正久, 摂食制限下の自発運動は、2型糖尿病モデルマウスの糖・脂質代謝とともにアミノ酸代謝も改善する, 第18回日本病態栄養学会年次学術集会, 2015年1月10日, 国立京都国際会館(京都府)
 7. 中熊美和, 有村恵美, 牛飼美晴, 大久保由梨, 上別府菜穂子, 朝沼亜由美, 萩原隆二, 高田昌実, 堀内正久, 高齢者栄養評価におけるアミノ酸を含む尿中窒素化合物測定の有用性, 第18回日本病態栄養学会年次学術集会, 2015年1月11日, 国立京都国際会館(京都府)
 8. Ancah Caesarina Novi Marchianti, Emi Arimura, Miharu Ushikai, Masahisa Horiuchi, Voluntary exercise under a food restriction condition decreases blood branched-chain acids levels, in addition to improvement of glucose and lipid metabolism, in *db* mice, animal model of type 2 diabetes, 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, 13 September 2014, 国立京都国際会館(京都府)
 9. 武石嘉一郎, 川口博明, 有村恵美, 谷本昭英, 堀内正久, ミニブタ睡眠モデルの解析, 共, 第84回日本衛生学会学術総会, 2014年5月27日, 岡山コンベンションセンター(岡山県)
 10. 有村恵美, Ancah Caesarina Novi Marchianti, 川口博明, 牛飼美晴, 堀内正久, 食事の中の蛋白質と炭水化物の2型糖尿病病態へ及ぼす影響, 共, 第84回日本衛生学会学術総会, 2014年5月27日, 岡山コンベンションセンター(岡山県)
 11. 沖田信夫, 有村恵美, 野崎剛, 小田原努, 坂口和顕, 小坂元理恵子, 堀内正久, 鹿児島市における地域・職域健診を基盤とするCKD対策の取り組みについて, 第87回日本産業衛生学会, 2014年5月24日, 岡山コンベンションセンター(岡山県)
 12. 有村恵美, Ancah Caesarina Novi Marchianti, 川口博明, 牛飼美晴, 堀内正久, エネルギー・脂質摂取量を揃えた条件下におけるたんぱく質・アミノ酸(プロリン)の糖尿病病態への影響, 共, 第17回日本病態栄養学会年次学術集会, 2014年1月12日, 大阪国際会議場(大阪府)
 13. 有村恵美, Ancah Caesarina Novi Marchianti, 川口博明, 牛飼美晴, 堀内正久, 同エネルギー・同脂質摂取量条件下で低蛋白高炭水化物食と高蛋白低炭水化物食の糖尿病病態への影響, 第25回日本糖尿病性腎症研究会, 2013年12月8日, 東京ガーデンパレス(東京都)
- [図書] (計 1 件)
1. 鹿児島県立短期大学チームカツオづくし 編, 「カツオ今昔物語~地域おこしから文学まで」, 筑波書房, 2015
- [その他]
- ホームページ等
<http://www.k-kentan.ac.jp/>
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~eisei01/index.html>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
 有村 恵美 (ARIMURA EMI)
 鹿児島県立短期大学・生活科学科・助教
 研究者番号: 40552964
 - (2) 研究分担者
 堀内 正久 (HORIUCHI MASAHISA)
 鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
 研究者番号: 50264403
 - (3) 連携研究者
 川口 博明 (KAWAGUCHI HIROAKI)
 鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科
 准教授
 研究者番号: 60325777
 - 口岩 聡 (KUCHIWA SATOSHI)
 鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科
 准教授
 研究者番号: 90161637