

## 論 文 要 旨

### Low-protein diet improves blood and urinary glucose levels and renal manifestations of diabetes in C57BLKS-*db/db* mice

〔低たんぱく食はレプチン受容体欠損 *db* マウスの血中や尿中のグルコースレベルと糖尿病腎所見を軽減する〕

有村 恵美

#### 【序論および目的】

2型糖尿病の発症率は、世界中で増加の一途をたどっている。発症率増加に伴い、糖尿病における3大合併症の1つである腎症も増加しており、糖尿病による主要な死因とされている。近年の2型糖尿病や糖尿病腎症増加の原因は、遺伝的因子よりも、食生活を含む生活習慣や環境因子の変化が大きいと考えられる。

米国糖尿病学会は、1986年より糖尿病腎症発症予防の為に、全ての糖尿病患者に食事中的たんぱく質量 0.8 g/kg/day (30kcal/kg/day の場合：たんぱく質エネルギー比率 10.7%) の摂取を推奨している。しかし、本邦では、糖尿病自体が慢性腎疾患のハイリスク群であるにも関わらず、糖尿病早期では、高たんぱく食傾向 (糖尿病食事指導に用いられる糖尿病食品交換表に掲載される推奨例：たんぱく質エネルギー比率 18%) にある。低たんぱく食事療法の有効性について科学的な検証が求められている。

2型糖尿病マウスを用いて、食事たんぱく質の糖代謝や腎所見に及ぼす影響について多くの報告がある。しかし、食事の設定条件が極端で、通常のヒトの食事とかけはなれている。

本研究では、ヒトが通常摂取する条件 (たんぱく質エネルギー比率 12-24%、動物性たんぱく質比率 50%、植物性たんぱく質比率 50%) の食事について、2型糖尿病腎症発症や進展に及ぼす影響を解析した。

#### 【材料および方法】

4週齢雄性2型糖尿病モデル (*db*) マウスとコントロール (CT) マウスを用いた。

##### ① ベースライン実験 (5週齢時点)

4週齢雄性 *db* マウス (n=6) と CT マウス (n=6) を購入し、1週間馴化後、6時間絶食後、ネンブータル麻酔下で心臓採血を行った。臓器重量測定および血液生化学検査を行った。

## ② 自由摂食実験

4週齢雄性 *db* マウス (n=18) と CT マウス (n=15) を購入し、1週間馴化後、たんぱく質エネルギー比率別に 24% (H群)、18% (M群)、12% (L群) の特殊食で8週間飼育した。

体重、摂食量、摂水量は毎週測定し、5,13週に空腹時血糖値 (FBG)、尿糖 (UG)、尿中アルブミン (U-Alb) を測定した。13週に、6時間絶食後、ネブタール麻酔下で心臓採血を行った。臓器重量測定および血液生化学検査を行った。組織標本を作製し、PAS染色後、画像解析ソフトで定量的に解析した。腎から RNA 抽出後 cDNA を調製し、特異的プライマーを用いて遺伝子発現解析 (リアルタイム PCR 法) を行った。

## ③ ペアーフェッド実験

4週齢雄性 *db* マウス (n=12) と CT マウス (n=5) を購入し、1週間馴化後、たんぱく質エネルギー比率別に 24% (H群)、12% (L群) の特殊食で10週間飼育した。*db*-H群の摂食量は、*db*-L群の摂食量に揃えた。体重、摂水量は毎週測定し、5,15週に FBG、UG、U-Alb を測定し、6,9,13,15週に HbA1c を測定した。15週に、6時間絶食後、ネブタール麻酔下で心臓採血を行った。臓器重量測定および血液生化学検査を行った。膵臓を摘出し、インスリン含量の測定と組織形態学的評価を行った。

### 【結果】

実験開始時 (5週齢) の FBG は、*db* マウスと CT マウスにおいて、有意な差を認めなかった。自由摂食実験では、*db*-L群は *db*-H群よりも摂食量、摂水量が有意に低値であり、摂食量、摂水量は、たんぱく質エネルギー比率依存的に増加していた。13週齢では、*db* マウスは高血糖を呈し、*db*-L群は *db*-H群よりも UG、U-Alb、尿素窒素、腎臓重量、糸球体内面積、PAS陽性面積、*transforming growth factor beta 1* と *procollagen  $\alpha$ 1 chain of type IV collagen* 発現レベル (腎臓) が有意に低値だった。血漿インスリン値は、*db* マウス5週齢の値と比べて、*db*-H群は有意に低値だった。CT マウスにおいて、摂食量、摂水量には差が認められなかった。13週齢では、CT-L群は CT-H群よりも U-Alb、腎臓重量、糸球体内面積、糸球体外面積、PAS陽性面積、*angiotensinogen* と *renin* 発現レベル (腎臓) が有意に低値だった。

ペアーフェッド実験では、*db*-L群は *db*-H群よりも摂水量が有意に低値だった。15週齢では、*db*-L群は *db*-H群よりも、HbA1c、FBG、UG、体重あたりの腎臓重量、尿素窒素が有意に低値で、最大ランゲルハンス島における  $\beta$  細胞の占める割合は有意に高値だった。

### 【結論及び考察】

- ① 2型糖尿病腎症発症や進展に及ぼす食事たんぱく質量の影響を解析することが可能なマウスモデルを確立した。
- ② 自由摂食実験では、*db* マウスにおいて、食事たんぱく質量が多いほど摂食量、摂水量が有意に多かったが、体重には有意な差がなかった。CT マウスにおいて、食事たんぱく質量の違いによって、摂食量、摂水量、体重に有意な差がなかった。食事たんぱく質量による摂食量、摂水量の違いは、*db* マウス特異的な現象と考えられた。ペアーフェッド実験では、*db* マウスにおいて、食事たんぱく質量が多いほど摂水量が有意に多かったが、体重は有意に少なかった。このことは、食事たんぱく質量が多いほど尿糖排泄増加によるエネルギー損失が多いことで説明されると考えている。
- ③ *db* マウスにおいて、食事たんぱく質量が少ないほど糖代謝や腎機能の悪化を軽減することから、低たんぱく食は、糖尿病腎症発症や進展予防に対して有効である可能性が示された。
- ④ CT マウスにおいても、食事たんぱく質量が少ないほど腎機能の悪化を軽減することから、一般のヒトにおける食事たんぱく質量の設定 (たんぱく質推奨量 0.9g/kg/day : 2010 食事摂取基準) の意義が確認された。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 212 号	学位申請者	有村 恵美
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	乾 明夫	副査 西尾 善彦
	副査	橋口 照人	副査 浅川 明弘

Low-protein diet improves blood and urinary glucose levels and renal manifestations of diabetes in C57BLKS-*db/db* mice

(低たんぱく食はレプチン受容体欠損 *db* マウスの血中や尿中のグルコースレベルと糖尿病腎所見を軽減する)

糖尿病患者は、医学・薬学が進歩しているにも関わらず増加の一途である。増加の背景として、食生活（西欧型の食事）や生活環境（運動不足）の変化が挙げられている。糖尿病患者の増加とともに、糖尿病腎症患者の増加も顕著であり、糖尿病は透析導入者増加の主要因とされている。しかし、現在の糖尿病食事療法は、西欧型の食事に近く、たんぱく質に関しては、たんぱく質エネルギー比率 18%とさらに高たんぱく質に設定されている。微量アルブミン尿が出現する糖尿病腎症第 2 期においてもエネルギー量の制限が中心であり、糖尿病自体が CKD（慢性腎疾患）のハイリスクであるにもかかわらず、一般健常者のたんぱく質摂取基準（日本人の食事摂取基準）よりも高い設定（標準体重あたり 1.0-1.2g/kg/day）となっているのが、現在の糖尿病食事療法の現状である。この食事療法が、糖尿病腎症増加の一要因ではないかと学位申請者は考えている。症例の検討のみでは、食生活に関する厳密な長期研究、機序解析は困難である。本研究では、糖尿病腎症発症・進展に及ぼす食生活の影響、特に食事たんぱく質について検討可能な動物モデルを確立し、その機序解明を試みた。学位申請者は、管理栄養士の目線で、自分が経験した日常診療に近い実験条件を設定し、実験を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 2型糖尿病腎症発症・進展に及ぼす食事たんぱく質量の影響について解析が可能なマウスモデルを野生型マウスと *db* マウス（レプチン受容体欠損マウス）を用いて確立した。
- 2) 野生型マウスにおいて、自由摂食条件でも摂食量に差がなかったが、高たんぱく質食により尿中アルブミン排泄増、腎肥大、組織変化、レニン・アンギオテンシン系・RAS 系遺伝子発現の亢進などの腎に対する悪影響が認められた。
- 3) *db* マウスにおいて、自由摂食条件では、食事たんぱく質含有量が多い程、有意に総摂食量・摂水量が多く、腎臓に対する悪影響（尿中アルブミン排泄増、腎肥大、組織変化）、糖代謝に対する悪影響（空腹時血糖値高値、尿糖高値）が大きかった。ペアフェッド条件では、高たんぱく質食による糖代謝に対する悪影響（HbA1c 高値、空腹時血糖値高値、尿糖高値、膵島β細胞比率低値）が認められた。

腎症予防・腎症治療に対して、RAS 系阻害剤の投与が行われている。野生型マウスに認められた高たんぱく質食における RAS 系遺伝子発現の亢進は、薬剤治療を考えるうえで考慮されるべき点であると思われた。またレプチン受容体欠損という遺伝的異常マウスの知見ではあるが、高たんぱく質食が、腎臓のみならず、糖代謝の面への悪影響を示した。本研究は、一般健常人を上回るたんぱく質を結果的に摂取することになる糖尿病患者（糖尿病腎症前期・早期）における食事療法を再検討する必要があることを示唆しており、非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 212 号		学位申請者	有村 恵美
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	乾 明夫	副査	西尾 善彦
	副査	橋口 照人	副査	浅川 明弘

主査および副査の5名は、平成24年10月22日、学位申請者 有村 恵美 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 自由摂食についてどのように考えていますか？

(回答) 臨床研究(外来・入院)では、摂食量を揃えるのが困難なので、動物実験を試みました。食事量(エネルギー量)を揃えないと食事療法の詳細な検討は難しいと考えています。

質問2) 腎臓だけでなく、神経や網膜について調べる予定はないですか？

(回答) 今後の展開として、たんぱく質が糖尿病網膜症に及ぼす影響について検討する予定です。

質問3) たんぱく質や脂質の種類についての病態への影響について調べる必要はないですか？

(回答) 今回の実験で得られた知見を単一の物質(アミノ酸、二糖類、多糖類など)を用いて検討しています。

質問4) 入院患者さんは、入院食に対して、白飯が多いと言われる方が多い。一般の食事は、白飯が少ないと思われるが、実際に、一般の日本人のたんぱく質摂取量はどのくらいですか？

(回答) 国民栄養調査の結果では、日本人のたんぱく質摂取エネルギー比率は14-15%です。糖尿病食品交換表のたんぱく質エネルギー比率が18%ですので、高たんぱく質食です。

質問5) 体重あたりで、たんぱく質摂取量を決めることになるので、肥満したdbマウスでは、野生型に比べて、たんぱく質摂取量が大きくなると思われるが、その点についてはどのように考えますか？

(回答) 摂食量も多いので、db-Lマウスと野生型Lマウスの体重あたりのたんぱく質摂取量は差がありません。

質問6) どのようなアミノ酸が、糖尿病を悪化させますか？

(回答) ロイシンなど多くのアミノ酸は、インスリン分泌を促進するという報告もあります。糖原生のアミノ酸が悪化させると考えています。

質問7) 高たんぱく質食では、ベータ細胞のアポトーシスが生じているのですか？

(回答) 実験結果からアポトーシスを生じていると考えていますし、報告(Linn T, et al. *Endocrinology*, 1999)もされています。

質問8) 食事たんぱく質の血圧への影響はないのですか？

(回答) 今回は、血圧を測定していないので、検討できていません。

質問9) 今回の結果は、実験を始める前から予想していたのですか？

(回答) いいえ。臨床経験より、脂質・エネルギー量を揃えた条件下で、低たんぱく質高炭水化物食と高たんぱく質低炭水化物食の比較では、糖代謝には差はなく、腎機能には有意な差があるという予想でした。結果に驚きましたが、食生活の変化状況、疫学調査等から考えるとインスリン分泌能の低い日本人には糖代謝にも高たんぱく質食は悪い可能性があると考えています。

## 最終試験の結果の要旨

質問 10) ペアフェッド実験とは、一般的に行われているものですか？

(回答) 自由摂食実験の方が多いです。食事療法の詳細な検討をするためには、ペアフェッド実験を行う必要がある場合もあると考えています。

質問 11) 膵組織の評価に Gomori 染色を用いているのは何故ですか？

(回答)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  細胞の区別をし、ランゲルハンス島中の全細胞数あたりの  $\beta$  細胞数の比を求めるためです。

質問 12) 摂水量が多くなるのは、高血糖のためですか？口渇感があるのですか？

(回答) スライドに示したように、摂水量と HbA1c 値において有意な正の相関 ( $r = 0.921$ ) が認められました。摂水量は HbA1c 値を反映しており、高血糖により多尿となり口渇が生じていると考えられます。

質問 13) 自由摂食実験とペアフェッド実験の終了時期が異なるのはなぜですか？

(回答) 自由摂食実験と同じ 12 週での終了予定でしたが、12 週の HbA1c 値のデータをみて、あと 3 週間延期すれば、HbA1c 値に有意差がつくと予測して、3 週間延期しました。

質問 14) ペアフェッドと自由摂食実験の *db-L* マウスで、血糖値などの数値が異なるのはなぜですか？

(回答) 摂食量を毎日測定した実験と 1 週間に 1 回測定した実験とで、測定・飼育条件の違いが結果に影響したと考えています。

質問 15) ペアフェッドマウスは、約 75% の摂食量であり、絶食時間が生じる。そのことはストレスであると思うが、病態への影響はどのように考えるのですか？

(回答) ストレスに関しては検討していません。

質問 16) グレリンの測定はしていますか？ (回答) 測定していません。

質問 17) *db* マウス以外の高脂肪食負荷動物や *KKAy* マウスなどでは、このような実験は報告ないのですか？

(回答) 糖尿病モデル動物を用いた検討では、脂質と炭水化物の検討が大半です。NOD マウスで、高たんぱく質食は、膵臓の  $\beta$  細胞のアポトーシスを促進するという報告があります。

質問 18) 脾臓重量は測定していますか？ (回答) 測定していません。

質問 19) たんぱく質の摂取量の変化とともに、炭水化物の摂取量にも違いがある。炭水化物の摂取量の影響はないのか？

(回答) 現在、混合液負荷試験 (二糖類・多糖類) を行っています。たんぱく質の摂取量の増加とともに炭水化物 (多糖類) の摂取量の減少も糖代謝悪化へ繋がったと考えています。

質問 20) 食餌は、どのくらい吸収されているのですか？

(回答) 吸収率の検討は、していません。

質問 21) ヒトでは、高たんぱく質食で、食欲低下が生じる。今回のケースとは異なるが、その理由は何か？

(回答) 野生型マウスでは、摂食量に差がありません。糖尿病マウス特異的な現象であり、高たんぱく質食の方が、尿糖高値であることより、尿糖損失のために過食が生じていると考えています。

質問 22) Advanced glycosylation end-product-specific receptor (*Ager*) 遺伝子発現は、他の糖尿病モデル動物で報告されていますか？

(回答) 把握していません。低たんぱく質食の方が高たんぱく質食より、*Ager* 遺伝子発現の抑制傾向がみられたので、実験の数が増えれば、有意差がつくと考えています。

質問 23) 尿中グルコース排泄を増加させる薬が開発されているが、その場合、食欲亢進は認めないとされている。今回のケースとは異なるように思うが、どのように考えますか？

(回答) 尿糖損失の量によると思います。尿糖損失が大きければ、その量を補うために食欲は亢進すると考えています。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。