

平成 26 年度豆類振興事業調査研究(雑豆需要促進研究)成果概要

1 課題名 小豆のオートファジー促進作用を介した糖尿病性腎症の保護効果の評価

2 研究者

青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科：教授 佐藤 伸、助手 片岡 沙織
神奈川県立保健福祉大学 保健福祉学部 栄養学科：准教授 向井 友花

3 成果概要

(1)研究目的

わが国の糖尿病の患者数は境界型を含めるとおよそ 2200 万人といわれている。また、健康日本 21 (第 2 次) では糖尿病の合併症の重症化予防は大きな目標の一つとして掲げられている。合併症のうち、とりわけ、腎症の重症化は健康寿命の延伸や QOL の維持に悪影響を及ぼすので、よりよい予防策の確立は急務である。

糖尿病性腎症の発症や進展では糸球体硬化や基底膜の肥厚等の病変が関連している。分子レベルでは、炎症、線維化や酸化ストレス等が関与しているが、近年、オートファジーの減弱や破たんが、腎症の進展に深く関係することがわかってきた¹⁾。オートファジーは、細胞内での異常あるいは劣化したタンパク質の蓄積を防いだり、栄養状態に応じてタンパク質を分解してアミノ酸のリサイクル等を行ったりしている。

糖尿病性腎症では、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mammalian target of rapamycin; mTOR) が活性化しているという²⁾。mTOR はタンパク質合成や遺伝子の翻訳等に働く。さらに、mTOR 活性の上昇はオートファジーの機能低下を招くといわれる³⁾。一方、カテキンやレスベラトロール等のポリフェノールは、オートファジーを制御するという知見が増えつつある⁴⁾。しかし、小豆ポリフェノール (小豆 PP) がオートファジーの機能を制御するか、さらに、オートファジーを介して糖尿病性腎症を軽減するかという知見はほとんどない。

そこで、本研究では、糖尿病の腎障害における小豆 PP の生理機能を明らかにするために、①小豆 PP は mTOR 活性を抑制し、腎臓の線維化等の組織障害を軽減するか、②もし、軽減するならば、小豆 PP は mTOR を介してオートファジー機能を促進するかを検討した。

(2)研究方法及び手法

小豆抽出液は株式会社遠藤製館からご好意でいただいた。その小豆抽出液をロータリーエバポレータで減圧濃縮して、総ポリフェノール濃度が 4 mg/ml になるように調整したものを「濃縮した小豆抽出液 (ABE)」として実験に供した。本研究は、青森県立保健大学動物実験委員会の承認を得て「青森県立保健大学動物実験に関する指針」に従って実施された。Wistar 系雄性ラット (6 週齢) の尾静脈にストレプトゾトシン (STZ) を単回投与 (55 mg/kg/bw) し、48 時間後の血糖値が 300 mg/dl 以上の動物を糖尿病モデルとした。糖尿病群は 0 mg/kg 群 (蒸留水のみ)、ABE 10 mg 及び 40 mg/kg 群の 3 群に分け、4 週間 (1 日 1 回)、強制胃内投与した。対照群 (健常ラット) には蒸留水を同様に投与した。投与期間中、体重を測定した。最終投与後に採血し、血漿及び腎臓皮質を採取した。血漿中のグルコース (Glc)、クレアチニン (Cr) 及び尿素窒素 (BUN) を測定した。目的とするタンパク質、すなわち、mTOR、リン酸化 mTOR (p-mTOR)、microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B)、p62/SQSTM1 (p62) はウェスタンブロット法により解析した。腎臓小片を化学固定し、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色あるいはコラーゲン線維を染めるシリウスレッド染色を施した。

(3) 結果及び考察

1) 体重、腎重量及び血液生化学検査

投与期間を通して対照群と比べて糖尿病ラット各群の体重は有意に減少した。0 mg/kg 群と ABE 群間に有意差は見られなかった。相対腎重量及び Glc 濃度は、対照群と比べて 0 mg/kg 群及び ABE 投与群で有意に増加していた。しかし、0 mg/kg 群と ABE 投与各群との間には有意な差はみられなかった。Cr 濃度は対照群と 0 mg/kg 群間で差はなかったが、0 mg/kg 群と比べて 40 mg/kg 群で有意に減少していた。BUN 濃度は対照群と比べて 0 mg/kg 群で有意に増加したが、40 mg/kg 群の濃度はやや減少していた。

2) 病理組織学的観察

糖尿病ラット各群では、糸球体のメサンギウム領域の拡大や皮髄境界部の尿細管上皮細胞の肥厚や脱落に関連した像がみられたが、0 mg/kg 群と ABE 群の間では、著しい差は認められなかった。糖尿病ラット群で、シリウスレッド染色された線維化領域の拡大が糸球体の基底膜やメサンギウム領域あるいは間質で観察されたが、0 と 40 mg/kg 群間では著しい差はみられなかった。これまで、当研究室において STZ 誘発糖尿病モデルラットに小豆種皮添加食を 10 週間摂取させたところ、腎臓のメサンギウム領域や間質の線維化面積が有意に減少したことを報告したが⁵⁾、本研究で投与した ABE 量や投与期間では線維化領域の軽減がみられなかった。

3) 腎臓皮質中の mTOR の発現及びリン酸化に及ぼす影響

mTOR 活性の促進は、オートファジーの機能低下につながるという⁶⁾。ABE 0 mg/kg 群の腎臓皮質中の p-mTOR 量は、対照群に比べて有意に増加していた (図 1)。これに対して、10 及び 40 mg/kg 群では 0 mg/kg 群に比べて有意に減少していた。このことは、ABE により mTOR 活性が低下することを示していた。一方、総 mTOR (t-mTOR) タンパク質発現量は、いずれの群においても有意な変化は認められなかった。

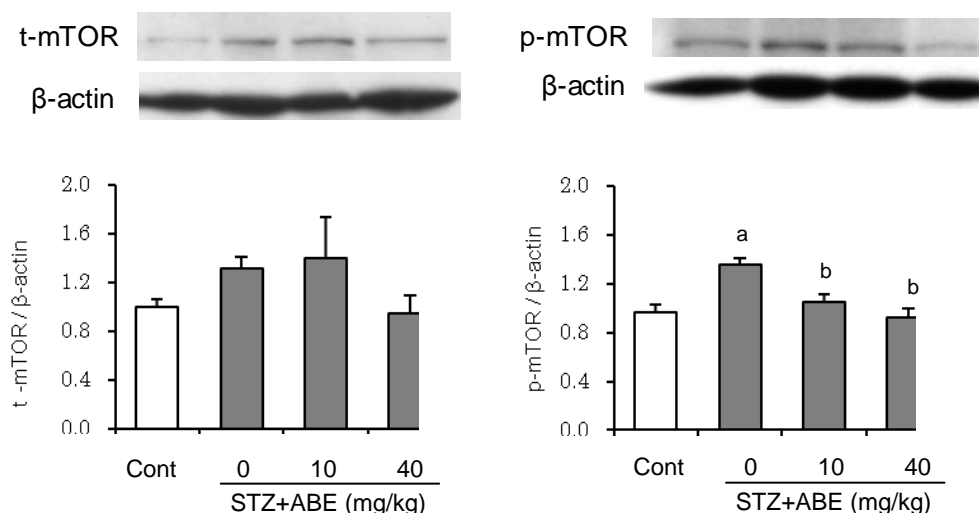


図 1. 総 mTOR (t-mTOR) 発現量及びリン酸化 mTOR (p-mTOR) 量に及ぼす ABE 投与の影響。値は、平均値±標準誤差 (n = 5-7) . ^aP < 0.05 vs. control 群. ^bP < 0.05 vs. STZ+0 mg/kg 群

4) 腎臓皮質におけるオートファジーに及ぼす影響

LC3 は、オートファゴソームに集積するタンパク質であり、哺乳類のオートファジーの指

標として知られているので⁷⁾、LC3B-I 及び-II 量をウェスタンブロット法により解析した。0 mg/kg 群の LC3B-II 量は、対照群と同様の値であった。一方、40 mg/kg 群の LC3B-II 量は、0 mg/kg 群に比べて有意に増加していた (図 2)。LC3B-I の発現量については各群間に著しい差はみられなかった。

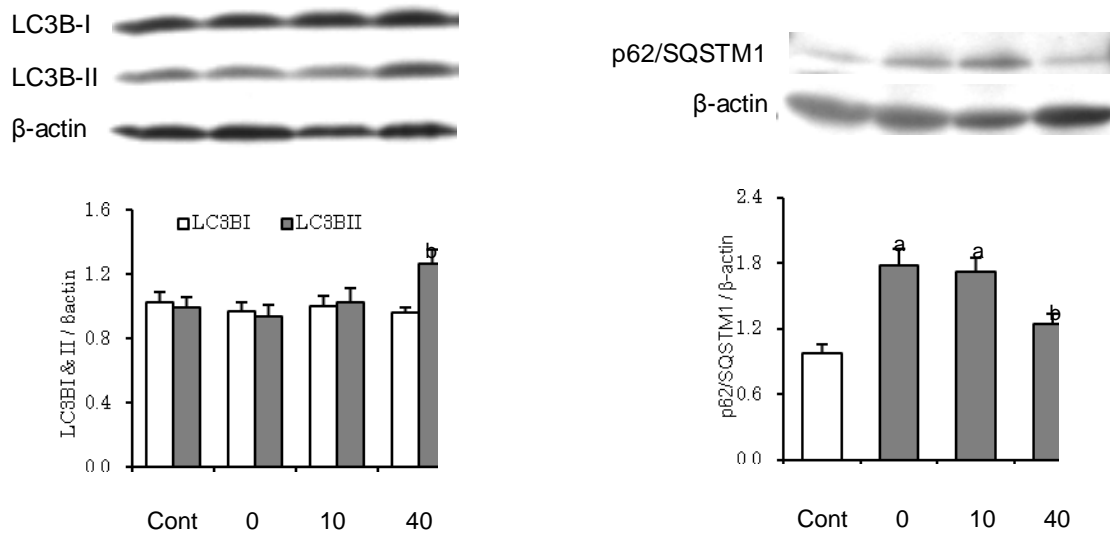


図 2. LC3B-I (左図) STZ+ABE (mg/kg) ;SQSTM1 (右図) 発現量に及ぼす ABE 投与 STZ+ABE (mg/kg) 値は、平均値±標準誤差 (n = 5-7) . ^aP < 0.05 vs. control 群. ^bP < 0.05 vs. STZ+0 mg/kg 群

p62 の発現は、オートファジーの分解の指標として知られている⁸⁾。0 及び 10 mg/kg 群の p62 発現量は、対照群に比べて増加していたが、40 mg/kg 群では、0 mg/kg 群に比べて有意に減少していた (図 2)。これらの結果から、ABE は糖尿病ラットの腎臓皮質においてオートファジーを促進することが示唆された。

以上のことから、次のことが明らかになった。ABE 投与により、①糸球体や間質の線維化の領域の軽減は認められなかったが、Cr 濃度は低下した。②mTOR 活性は低下した。③LC3B-II 量が増加し、加えて p62 発現量が減少した。これらの結果は ABE 投与により mTOR 活性の低下に関連したオートファジーが促進することを示唆していた。

今後、オートファジーについての詳細な作用機序を検討する必要があるが、本研究の結果から小豆の有効利用に関して小豆抽出液を摂取することは、少なくとも、腎臓のオートファジーの促進を介して腎症の重症化の予防あるいは改善に資するものと期待される。

(4)参考文献

- 1) Kitada M, et al. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:908185.
- 2) Lloberas N, et al. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:1395-404.
- 3) Zoncu R, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:21-35.
- 4) Pallauf K, Rimbach G. *Ageing Res Rev*. 2013;12:237-52.
- 5) Sato S, et al. *J Nutr Biochem*. 2005;16:547-53.
- 6) Huber TB, et al. *Autophagy*. 2012;8:1009-31.
- 7) Mizushima N, et al. *Cell*. 2010;140:313-26.
- 8) Pankiv S, et al. *J Biol Chem*. 2007;282:24131-45.