

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 樋口 裕樹
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 962 号
学位授与の日付 令和2年9月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Rice Endosperm Protein Administration to Juvenile Mice Regulates Gut Microbiota and Suppresses the Development of High-Fat Diet-Induced Obesity and Related Disorders in Adulthood
(幼少期における米胚乳タンパク質の摂取が成熟期の高脂肪食負荷による肥満および肥満関連腎症に及ぼす影響)

論文審査委員 主査 教授 曾根 博仁
副査 准教授 横山 純二
副査 准教授 後藤 眞

博士論文の要旨

【背景、目的】「米」はアジアを中心に主要穀物として消費され、エネルギー供給源としての役割がある。他方、米は6%のタンパク質を含んでいるが、本邦においては、米由来のタンパク質摂取が肉や魚に次いで3番目に多く、さらに植物性タンパク質としては最も多いことから、生体に対する様々な機能性を有していると考えられる。日本人の健康に対する米タンパク質の寄与を明らかにすべく、申請者らはこれまでに、ヒトにおける米胚乳タンパク質 (rice endosperm protein, REP) 摂取による脂質代謝改善作用や、非肥満2型糖尿病モデル GK ラット、肥満2型糖尿病モデル ZDF ラットの腎障害を改善することを明らかにした。また透析患者における有効で安全な補給タンパク質になることを見出した。

肥満は世界的に深刻な課題であり、メタボリックシンドロームおよび2型糖尿病の発症に関連している。さらに、メタボリックシンドロームおよび2型糖尿病の患者は、腎疾患および肝疾患を含む合併症を誘発する可能性がある。肥満の発症は生活習慣と密接に関連しているとされ、特に若年期の栄養は、青年期および成人期における肥満および関連疾患の発症に強く寄与することが報告されている。

そこで申請者は幼少期における摂取タンパク質源の違い、REP 摂取による成熟期の肥満および肥満関連腎症への影響を検討した。

【方法】4週齢(幼少期)の C57BL/6J マウスにカゼイン(CAS)または REP をタンパク質源とする通常食を与え、10週齢(成熟期)からタンパク質源を CAS または REP とした高脂肪食負荷を行い、食事誘導性肥満モデルを作製した。体重、体脂肪量、血圧、血液・尿検査、腎病理所見、炎症性サイトカイン、エネルギー消費量、便中の脂質排泄量、および 16S rRNA 遺伝子解析による腸内細菌叢の測定を行い、二元配置分散分析を用いて検定した。

【結果】体重、体脂肪量、総コレステロール、血糖および尿中アルブミン排泄量は、幼少期または成熟期における REP の摂取により CAS 摂取に比較して有意な増加抑制が認められた。腎病理所見では、幼少期

の REP の摂取により糸球体およびメサンギウム領域の面積、近位尿細管の空胞形成所見（面積）が有意に減少していた。群間のエネルギー消費量に有意な差は認められず、幼少期の REP の摂取により便中の脂質排泄量は有意に増加した。REP 摂取により高脂肪食負荷による腸内細菌叢の多様性の低下が抑制され、エンドトキシン産生に関連する *Escherichia* 属はその存在比が有意に低値であった。グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）結合タンパク質（LPS binding protein, LBP）の産生や、LPS に関連するとされている炎症性サイトカインの IL-6 や TNF- α の産生も、血清、腎、肝のいずれにおいても抑制されていた。CAS と REP のアミノ酸組成比で構成したアミノ酸混合物を給餌した際には、これまで示したような肥満抑制効果は認められなかった。次にペプチドの関与についてディスク法および濁度法によって検討したとこと、REP の人工消化ペプチドに Proteobacteria 門の一つである *Escherichia coli* (*E. coli*) の抗菌活性が認められた。

【考察】肥満および関連疾患の発症は、ヒトおよびマウスの腸内細菌叢の変化と関連しているとの報告がある。さらに食事は腸内微生物叢の調節に関与している。しかしこれまでに、腸内細菌叢に対する REP の影響と肥満および関連疾患の発症を評価した研究はない。幼少期の REP 投与は Proteobacteria (*Escherichia*) の増殖抑制に関与する可能性があり、それは内毒素である LPS の産生を低下させ、インスリン抵抗性に関連する軽度の慢性的な炎症を抑制させる。さらに、幼少期の REP 摂取による腸内細菌叢に対する影響のようなプレコンディショニングは、成熟期の高脂肪食負荷におけるタンパク質源が CAS に変化した後でさえも持続した。幼少期の生活習慣は、腸内細菌叢が形成される重要な時期であり、この時期の食事と密接に関連していると考えられている。したがって、本研究は、幼少期の REP 摂取が腸内細菌叢の多様性を維持し、成熟期の肥満および肥満関連腎症を予防するのに役立つ可能性を示唆した。

食品由来のタンパク質またはペプチドは、抗菌活性を有することが報告されている。申請者らは REP の酵素加水分解物に由来するペプチド画分が *in vitro* で *E. coli* に対して抗菌活性を有することを確認した。CAS と REP のアミノ酸組成で構成したアミノ酸混合物を含む高脂肪食を負荷した肥満モデルマウスを検討したが、マウスの体重、脂肪、肝臓、および腎臓重量には有意な差は認められなかった。以上より本研究では、腸内細菌叢への影響には REP のアミノ酸組成が重要ではなく、REP に由来するペプチドが腸内細菌叢の多様性を調節する可能性を示唆した。

これまでに REP または REP に由来するペプチドが、脂質と胆汁酸を吸着し、便中への排泄を増加させることが *in vivo* で示唆されている。本研究においても REP の摂取により便中への脂肪酸や胆汁酸の排泄量が増加しており、その効果は高脂肪食負荷時の REP 摂取により顕著であったことから、以前に報告されたものと類似していた。

【結論】幼少期の REP 摂取が腸内細菌叢に関与し、高脂肪食負荷による肥満および肥満関連腎症の発症、進展を予防する可能性が示唆された。マウスの腸内細菌叢が、特に幼少期における摂取タンパク質源によって変化し得ることを示した。さらに、REP 投与により Proteobacteria (*Escherichia*) の存在率の低下は、その内毒素であるエンドトキシンに関連する慢性的な軽度の炎症を抑制する可能性がある。加えて、REP またはそのペプチドは、脂質を吸着し排泄させる効果を示し、糞中脂質排泄量を増加させる。REP の臨床での効果を評価し、幼少期の米主体の食事を推奨するためには、ヒトにおけるさらなる研究が必要である。

審査結果の要旨

本邦では米由来タンパク質は肉や魚に次いで多く、植物性タンパク質としては最も多い。若年期の栄養は、青年期および成人期における肥満および関連疾患の発症に強く寄与することが報告されている。本論

文では幼少期における米胚乳タンパク質 (REP) 摂取による成熟期の肥満および肥満関連腎症への影響を検討した。4 週齢マウスにカゼイン(CAS)または REP をタンパク質源とする通常食を与え、10 週齢から高脂肪食負荷による食事誘導性肥満モデルを作製した。体重、体脂肪量、総コレステロール、血糖および尿中アルブミン排泄量は、幼少期または成熟期における REP の摂取により有意な増加抑制を認めた。腎病理所見では、幼少期 REP 摂取により糸球体およびメサンギウム領域の面積、近位尿管の空胞形成所見 (面積) が減少していた。また REP 摂取により高脂肪食負荷による腸内細菌叢の多様性の低下が抑制され、エンドトキシン産生に関連する *Escherichia* 属の存在比が低下した。リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 結合タンパク質 (LPS binding protein, LBP) の産生や、LPS に関連するとされている炎症性サイトカインの IL-6 や TNF- α の産生も、血清、腎、肝のいずれにおいても抑制されていた。

以上、幼少期の REP 摂取が、腸内細菌叢の変化を介して成人期以降の肥満および肥満関連腎症の発症、進展を予防する可能性が示した点に本論文の博士論文としての価値を認める。