

糖尿病ラットにおける腎肥大ならびに IGF-I 遺伝子発現に及ぼす 大豆たん白質の影響

宇都宮一典¹・池田義雄^{*2}

¹東京慈恵会医科大学内科学講座第3 ²東京慈恵会医科大学健康医学センター

Influence of Soy Protein on Renal Hypertrophy and IGF-I Gene Expression in Diabetic Rats

Kazunori UTSUNOMIYA¹ and Yoshio IKEDA²

¹Department of Internal Medicine (III), The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105

²Center for General Health Care, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105

ABSTRACT

One of early renal manifestations of diabetes mellitus includes renal hypertrophy which is preceded by an accumulation of IGF-I peptide in the kidney. Protein nutrition has a profound influence on renal hypertrophy in diabetes. In this study, we examined the influence of proteins of different quality on renal hypertrophy and IGF-I mRNA expression in renal cortex using diabetic rats. Male Wistar rats were made diabetic with intravenous injection of streptozotocin (STZ). Then, the rats were divided into four groups, namely the normal controls, the diabetic rats fed with regular diet, the diabetic rats fed with 35% casein diet and the diabetic rats fed with 35% soy protein diet. Killing the rats at one week after induction of diabetes, we weighed the kidney. Extracting total RNA from renal cortices, we examined IGF-I mRNA expression with Northern blot analysis. Compared to the normal controls, the kidney weight was increased in the diabetic rats on regular diet and further increased on casein diet. However, there was no significant difference in the kidney weight between the diabetic rats on regular and soy protein diet. Renal IGF-I mRNA expression was also increased in the diabetic rats and further increased with casein feeding. In contrast, soy protein had no additional influence on renal IGF-I in the diabetic rats. These data suggest that quality difference in ingested protein is closely related to the development of renal hypertrophy in diabetes through renal IGF-I mRNA expression. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 87-91, 1997.

Key words: diabetic nephropathy, renal hypertrophy, IGF-I, soy protein, casein

たん白質の摂取制限が、腎不全における腎機能障害

の進展抑制効果を有することは、従来より知られていたが、近年、糖尿病性腎症から透析療法への導入例が増加するにつれ、低たん白質食が糖尿病性腎症の治療

*〒105 東京都港区西新橋 3-25-8

食として、臨床応用されるに至っている。しかし、たん白質栄養が糖尿病性腎症の腎病変に与える影響についての基礎的検討は、十分とは言えない。殊に、動物性ないしは植物性たん白質といった、たん白質の質の差異が及ぼす影響についての検討は極めて少ない。糖尿病では、発症早期から腎肥大を生じ、糖尿病性腎症に至る初期病変とみなされているが、この際、腎皮質に IGF-I および IGF-I 受容体の発現の増強を認めることから¹⁾、IGF-I を中心とする成長因子が、腎肥大の成立機序に関与するものと考えられている。そこで本研究では、たん白質栄養が、糖尿病における腎肥大形成機序に及ぼす影響、特に、質の異なるたん白質が及ぼす影響の差異を明らかにする目的で、糖尿病ラットに高カゼイン食、高大豆たん白質食をそれぞれ負荷し、腎肥大、および腎皮質における IGF-I 発現の変化を比較検討した。

方 法

体重200 g の雄性 Wistar 系ラットに、尾静脈から streptozotocin (STZ) 40 mg/kg を投与し、翌日の血糖が300 mg/100 mL 以上を示したものを糖尿病とした。ラットを、正常対照群(N=4)、通常の実験食を自由摂取させた糖尿病ラット(糖尿病通常食群、N=5)、35%カゼイン含有食を自由摂取させた糖尿病ラット(糖尿病カゼイン群、N=5)、35%大豆たん白質(フジプロ-R)含有食を自由摂取させた糖尿病ラット(糖尿病大豆たん白質群、N=4)の4群に分別した。1週間後、ラットの体重を測定した後、麻酔下に断頭屠殺し、腎を摘出、皮質を分離して、直ちに液体窒素下に凍結した。また、血液を採取し、血清を分離した後、血糖、血清総コレステロール及び中性脂肪の測定に用いた。

凍結した腎皮質は、solution D を添加して、そのままホモジェナイズし、acid guanidinium-phenol-chlo-

roform法によって総RNAを抽出した。得られた RNA を 1% agarose/formaldehyde gel 内で電気泳動し、これを nitrocellulose filter に転写して、Northern blot 解析に用いた。ラット IGF-I およびラット GAPDH の cDNA の 5'末端を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP および T4 polynucleotide kinase を用いて標識し、それぞれを probe として使用した。ハイブリダイズ後の各バンドは、Fujix Imaging Analyzer Bass 2000 によって、その強度を定量化して測定した。

ラット IGF-I (40 b)、ラット GAPDH (40 b) は、オンコジーンサイエンス (OSI) 社より市販のものを、オリゴヌクレオチド cDNA 5'末端のラベリングには、標識キット MEGALABEL (宝酒造) を用いた。また、血糖、血清総コレステロール、中性脂肪の測定は、自動分析装置によった。

統計

独立した2群の差の有意差検定には、Student の *t* 検定を用い、危険率0.05以下を有意とした。成績は mean $\pm$ SD で表した。

成 績

体重、血糖、血清脂質の変化 (Table 1)

摂食量には、糖尿病の3群間に差異は認められなかった。体重は、正常対照群に比較して、糖尿病通常食群、糖尿病カゼイン群、糖尿病大豆たん白質群で、いずれも有意の低下を示したが、糖尿病ラットの3群間には差異はなかった。血糖は、糖尿病の3群はいずれも500 mg/100 mL 前後の高値を示したが、3群間には差異は認められず、カゼイン並びに大豆たん白質の摂取は、血糖に影響を与えないことが判明した。血清総コレステロールは、正常対照群に比較して、糖尿病通常食群、糖尿病カゼイン群で有意の上昇を認めたが、糖尿病大豆たん白質群では、この変化は抑制されており、大豆たん白質による血清コレステロール低下効果

Table 1. Change in body weight, plasma glucose and lipids

	(n)	Body weight g	Plasma glucose mg/100 mL	TC mg/100 mL	TG mg/100 mL
Normal control	(4)	260 $\pm$ 7	127 $\pm$ 5	66 $\pm$ 8	78 $\pm$ 26
Diabetic rats on regular chow	(5)	231 $\pm$ 11*	547 $\pm$ 31*	142 $\pm$ 54*	545 $\pm$ 415*
Diabetic rats on 35% casein	(5)	212 $\pm$ 4*	544 $\pm$ 50*	127 $\pm$ 24*	781 $\pm$ 669*
Diabetic rats on 35% soy protein	(4)	207 $\pm$ 12*	589 $\pm$ 98*	98 $\pm$ 33	760 $\pm$ 420*

**P* < 0.05 vs Normal control. Mean $\pm$ SD. TC, Total cholesterol; TG, Triglyceride.

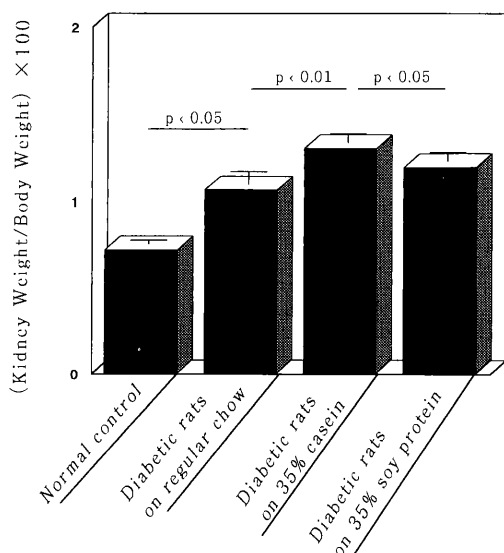


Fig. 1. Influence of protein nutrition on renal hypertrophy (mean±SD).

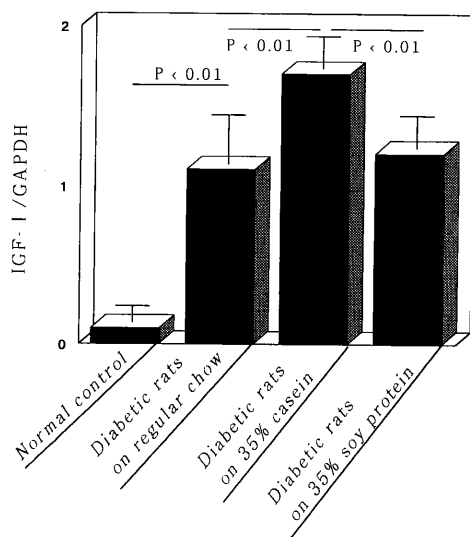


Fig. 2. Influence of protein nutrition on renal IGF-I expression (mean±SD).

が示唆された。血清中性脂肪は、正常対照群に比較して、糖尿病の3群で著しい高値を示していたが、カゼイン食、大豆たん白質食による影響は認められなかった。

腎重量の変化 (Fig. 1)

実験終了時の腎重量は、正常対照群に比較して、糖尿病通常食群で有意の増加を認めた。また、糖尿病カ

ゼイン群では、糖尿病通常食群に比較して、さらに腎重量の増加を認めた。一方、糖尿病大豆たん白質群では、腎重量は糖尿病通常食群と有意な差異はなく、糖尿病カゼイン群に比較して有意に低重量であった。

腎皮質 IGF-I 発現の変化 (Fig. 2)

腎皮質 IGF-I mRNA 発現量の変化を、同時に検討した GAPDH mRNA との比において表した。IGF-I の発現は、正常対照群に比較して、糖尿病通常食群で有意の増強を認めた。また、糖尿病カゼイン群では、糖尿病通常食群に比較して、一層の発現増強を認めた。これに対して、糖尿病大豆たん白質群における腎皮質 IGF-I の発現は、糖尿病カゼイン群に比較して弱く、糖尿病通常食群と同程度にとどまった。

考 案

近年、糖尿病性腎症から腎不全に至る症例が急増しており、腎不全の保存期に低たん白質食が処方される機会が増している。しかし、糖尿病性腎症における低たん白質食の効用を論ずるにあたっては、開始時期、たん白質所要量、摂取たん白質の質、および糖、脂質代謝に及ぼす影響など、糖尿病にまつわる未解決の問題点を残している。低たん白質食の腎庇護効果は、腎血流負荷の軽減を介するものとされているが、たん白質摂取による腎血流の増加は、たん白質の質により異なることが知られている²⁾。殊に、動物性たん白質に比較して、大豆たん白質を中心とする植物性たん白質は腎血流に及ぼす影響が軽微であることが見出されており³⁾、かかる摂取たん白質の質の相違が、その臨床効果に影響を与える可能性が考えられるが、現在までにその検討例はみられない。この点を明らかにする目的で、本研究では、STZ 糖尿病ラットにカゼイン食ならびに大豆たん白質食を自由摂取させ、糖尿病性腎症の初期病変とされる腎肥大形成に対する短期的な影響を観察したところ、カゼイン食は腎肥大を助長したのに対し、大豆たん白質食はこれを助長することはなかった。また、この際、腎皮質に発現する IGF-I mRNA は、糖尿病発症と共に増強を示し、カゼイン食はこれをさらに増強せしめたのに対し、大豆たん白質食にはこの変化は認められず、腎重量と IGF-I 発現の間には、極めて深い連関が存在することが示されたのである。すなわち、摂取たん白質の質の相違は、糖尿病性腎症の初期病変の成立機序に密接な関係を有し、その後の進展に影響をもたらす可能性が示唆されたものと考えられる。

IGF-I は、IGF-II と並んで、インスリンと50%のア

ミノ酸組成の相同性を有するインスリンファミリーであり、IGF-I 受容体は、インスリン受容体と同様に α 、 β サブユニットからなるヘテロダイマー構造を形成する。 β サブユニットにチロシンリン酸化活性部位を有し、IRS-1 をリン酸化基質とする。実験的糖尿病ラットを用いた検討では、腎皮質における IGF-I たん白質の増加⁴⁾、IGF-I mRNA の発現増強⁵⁾、IGF-I 結合たん白質の発現増加が確認されており⁶⁾、また somatostatin analogue の投与により、腎肥大と腎 IGF-I 発現が同時に抑制されることから⁷⁾、糖尿病における腎肥大の形成機序に IGF-I が重要な意義を有するものと考えられている。実際、糖尿病の発症と同時に、チロシンキナーゼ系カスケードの下流に位置するとされる c-fos、c-jun といった転写因子活性が糸球体内で上昇することから⁸⁾、IGF-I が何らかのたん白質合成系を亢進せしめることが考えられる。また、IGF-I は、腎への直接作用として腎血流動態の亢進、すなわち GFR の増加をもたらすことが知られており⁹⁾、これら

の作用を介して糖尿病性腎症の初期病変の成立機転を促すものと考えられる。IGF-I は、腎組織では、糸球体上皮細胞、メサングウム細胞、遠位尿細管、集合管に mRNA の発現が認められており¹⁰⁾、これらの局所作用が、病態と深い関わりを有すると推察されるが、IGF-I の局所調節のメカニズムはほとんど解明されていない。今回の検討では、糖尿病における腎 IGF-I 発現に摂取たん白質の質が重要な影響を与えることが明らかとなった。すなわち、腎血流の面から、影響の差異が報告されている動物性たん白質と植物性たん白質では、腎 IGF-I 発現にも異なった効果を有することが示されたのである。腎 IGF-I 発現を促す具体的なシグナルの相違は、今回の検討では不明であるが、かかる知見は、糖尿病性腎症患者のたん白質栄養を処方する際、たん白質の質の差異を念頭に置き、腎症初期には血流負荷を軽減するたん白質組成を考慮すべきことを示唆する基礎的根拠を提示するものと考えたい。

要 約

ストレプトゾトシン糖尿病ラットにカゼイン及び大豆たん白質を摂取させ、腎肥大、腎における IGF-I 発現の差異を検討した。ラットを正常対照群、通常食糖尿病群、35%カゼイン食糖尿病群、35%大豆たん白質糖尿病群とし、1週間後、腎重量を測定、腎皮質から RNA を抽出して、Northern blot 解析を行い、IGF-I の発現を検討した。糖尿病ラットでは、腎肥大を認め、カゼイン食ではさらに増加したが、大豆たん白質食では影響がなかった。腎 IGF-I の発現もこれと同様の変化を示し、たん白質栄養の差異が、糖尿病性腎症に影響を及ぼすことが示唆された。

文 献

- 1) Hammerman MR and Miller SB (1993) : The growth hormone insulin-like growth factor axis in kidney revisited. *Am J Physiol*, **265**, F1-14.
- 2) Nakamura H, Ebe N, Ito S and Shibata A (1993) : Renal effect of different types of protein in healthy volunteer subjects and diabetic patients. *Diabetes Care*, **16**, 1071-1075.
- 3) Kontessis P, Jones SL and Dodds RA (1990) : Renal, metabolic and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins. *Kidney Int*, **38**, 136-144.
- 4) Flyvbjerg A, Thorlacius-Ussing O, Nearaa R, Ingerslev J and Orskov H (1988) : Kidney tissue somatomedin C and initial renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetologia*, **31**, 310-314.
- 5) Bach LA, Stevenson JL, Allen JT, Jerums G and Herington AC (1991) : Kidney insulin-like growth factor-I mRNA levels are increased in postpubertal diabetic rats. *J Endocrinol*, **129**, 5-10.
- 6) Flyvbjerg A, Kessler U, Dorka B, Funk B, Orskov H and Kiess W (1992) : Transient increase in renal insulin-like growth factor binding proteins during initial kidney hypertrophy in experimental diabetes in rats.

- Diabetologia*, **35**, 589-593.
- 7) Flyvbjerg A, Frystyk J, Thorlacius-Ussing O and Orskov H (1989) : Somatostatin analogue administration prevents increase in kidney somatomedin C and initial renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetologia*, **32**, 261-265.
- 8) Shankland SJ and Scholey JW (1993) : Expression of growth-related protooncogenes during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*, **47**, 782-788.
- 9) Miller SB, Hansen VA and Hammerman MR (1990) : Effect of growth hormone and IGF-I on renal function in rats with normal and reduced renal mass. *Am J Physiol*, **259**, F747-751.
- 10) Hirschberg R and Kopple JD (1995) : Insulin-like growth factor I and renal function. *Diabetes Reviews*, **3**, 177-195.