課題番号	22若5

若手研究者助成金　実績報告書

令和　6年　4月　30日

氏　　名：	青木　亮二
所属・資格：	医学部・助教
実施研究所：	医学部・総合医学研究所

1　研究課題

和文表記（40字以内）
低出生体重-非肥満2型糖尿病モデルマウスに対するホエイプロテインの発症予防効果

英文表記
Preventive effects of type 2 diabetes by whey protein in a low birth weight-non-obese type 2 diabetes mouse model

2　研究期間

令和　4年度

※令和　4年度　～　令和5年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究目的

実臨床で低出生体重児が若年で非肥満型の2型糖尿病を発症するとの報告が散見される。早産・低出生体重児が2型糖尿病を発症しやすい原因として、早産児は満期産児に比べて酸化ストレスマーカーの値が高いことが報告されている。さらに、男性は女性よりも酸化ストレスマーカーのレベルが高いことが報告されており、その結果、男性は2型糖尿病や心血管イベントを起こしやすいとされている。ホエイプロテインの筋肉合成の促進、グルコースおよび脂質代謝の改善効果、ならびに抗炎症および抗酸化作用により、乳幼児期、幼児期、思春期前にホエイプロテインを多く含む食事を与えることは、その後の糖尿病の発症を予防することにつながると考えられる。しかし、ホエイプロテインがこれらの効果を発揮するメカニズムについては、まだ完全に解明されていない。

そこで本研究では、胚発生から成体までホエイプロテインを曝露した雄マウスを、同時期にカゼインタンパク質食に曝露して飼育したマウスと比較して、身体的および生化学的変化を測定することにより、ホエイプロテインがグルコースおよび脂質代謝に及ぼす影響を調べ、体脂肪減少に関与する潜在的メカニズムを明らかにすることを目的とした。

課題番号	22 若 5

4　研究概要

日本では総出生数は減少しているが低出生体重児は増加している。低出生体重児は、成人期の内臓脂肪増加による非肥満型糖尿病の発症リスクが高い。それゆえ、その予防法と治療法の開発が喫緊の課題である。我々は、子宮内虚血操作により低出生体重-非肥満 2 型糖尿病マウスモデルの作成に世界で初めて成功した（特願 2020-116354）。本研究の目的は、低出生体重-非肥満 2 型糖尿病マウスモデルが、糖代謝改善作用を持つホエイプロテインを幼仔期から摂取することにより糖尿病発症を予防できるかを明らかにすることである。

妊娠 19 日に出生した新生仔マウスを虚血群、非虚血（コントロール）群の 2 群に分類し、連日体重計測を行う。虚血群と非虚血群のマウスを離乳後（生後 4 週）から成獣（生後 8 週）まで、①たんぱく質をカゼインとした普通食、②たんぱく質をホエイプロテインとした普通食に分けて飼育する。8 週齢に 12 時間絶食にした後、イソフルランで吸入麻酔（導入 5%、維持 2%）を行い、心臓より全採血、膀胱より採尿を行い、臓器（肝臓、筋肉、脂肪組織）を摘出する。血液と尿を用いて、2 型糖尿病に関連する糖代謝・脂質代謝に関する生化学的検査を行う。空腹時血糖が 126 mg/dL 以上を糖尿病と診断する。肝臓、筋肉および脂肪組織から RNA を抽出し、PPAR ファミリー遺伝子の発現解析を RT-qPCR で行う。また、肝臓および筋肉を用いてメタボローム解析を行った。

5　研究結果

【体重の経過】

出生時の体重は、両群間に有意差はなかった。その後 1 週間ごとに、ホエイ群ではカゼイン群より体重が減少した。12 週目では、体重はカゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった（48.3g vs 61.0g, p <0.01）。

【血糖値、インスリン、インスリン抵抗性（HOMA-IR)】

空腹時血糖値は、2 群間で有意差はなかった（177.5 mg/dL vs. 184.7 mg/dL, p = 0.75）。IRI は、カゼイン群よりもホエイ群でわずかに低かった（22.0 μIU/mL vs. 47.0 μIU/mL, p = 0.07）。HOMA-IR は、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった（7.9 vs. 19.2, p = 0.02）。

【脂肪重量と体組成】

脂肪重量は、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった（2.4g vs. 3.8g, p < 0.01）。体組成は、除脂肪（67.9% vs. 64.7%、p = 0.63）および脂肪（32.0% vs. 35.3 %、p = 0.63）において両群で類似していた。

【血清および尿中クレアチニン】

クレアチニン値は、血清ではホエイ群がカゼイン群よりわずかに高く（0.11 mg/dL vs. 0.14 mg/dL, p = 0.06）、尿では有意に高かった（35.8 mg/dL vs. 54.6 mg/dL, p = 0.02）。

【血清リポ蛋白質分画】

コレステロール値については、総量、個数ともに両群間に有意差は認められなかった（総量：173.51 mg/dL vs. 153.46 mg/dL, p = 0.63; CM: 1. 06 mg/dL vs. 2.99 mg/dL, p = 0.11; VLDL: 10.85 mg/dL vs. 10.94 mg/dL, p = 0.94; LDL: 25.16 mg/dL vs. 23.38 mg/dL, p = 0.52; HDL: 136.44 mg/dL vs. 116.16 mg/dL, p = 0.26) (Figure 3a-e). 一方、トリグリセリド値は、測定したすべての結果について、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった（総計：51.47 mg/dL vs. 119.2 mg/dL, p = 0.01; CM: 4. 34 mg/dL vs. 17.92 mg/dL, p = 0.01; VLDL: 34.66 mg/dL vs. 73.48 mg/dL, p = 0.04; LDL: 9.42 mg/dL vs. 22.09 mg/dL, p = 0.01; HDL: 2.06 mg/dL vs. 7.14 mg/dL, p = 0.01）。

【肝遺伝子発現】

RT-qPCR 解析の結果、PPARα の肝発現は、カゼイン群よりもホエイ群でわずかに高かった（p = 0.08）；しかし、評価した他の脂質代謝関連遺伝子（PPARγ、p = 0.27； SREBP1c、p = 0.73； HSL、p = 0.58； LPL: p = 0.25 ）では他に差異は認められなかった。

〔5　研究結果（つづき)〕

【脂肪代謝】

主成分分析または階層的クラスタリングヒートマップの結果は、グループ間で有意な差はなかった。グルタチオン、1-メチルニコチンアミド、ミオイノシトールリン酸（1-リン酸＋3-リン酸）のレベルは、カゼイン群よりもホエイ群で有意に高かった（$p < 0.01$, $p = 0.04$, $p = 0.01$)。

結語

胎児期に開始したホエイプロテイン介入は、抗炎症作用や抗酸化作用を持ついくつかの代謝物のレベルを上昇させ、脂肪体重の減少やインスリン抵抗性の改善につながると思われた。

課題番号	22若5

6　将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類　（※研究計画書に記載したものを記入すること）

日本小児内分泌学会未来開拓研究助成、公益財団法人母子健康協会小児医学研究助成、一般財団法人近藤記念医学財団学術奨励賞、公益財団法人小児医学研究振興財団アサヒグループ食品（和光堂）研究助成金

7　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否

8　学会発表等

要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
中﨑公隆	第66回日本新生児成育医学会・学術集会	ホエイたんぱくの体脂肪減少効果の機序：カゼインたんぱくとの比較	2022年11月

9　著書・雑誌論文

著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Kimitaka Nakazaki, Ryoji Aoki	Nutrients/Body Fat-Reducing Effects of Whey Protein Diet in Male Mice	15・10	2023年5月	MDPI

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

特になし。

課題番号	22若5

１１　他の研究への発展

現在、低出生体重-非肥満２型糖尿病マウスモデルを用いて成長ホルモン投与による体組成やインスリン抵抗性の改善の有無について研究を行っている。本研究でホエイプロテインが糖尿病の予防に寄与することが明らかとなりであり、今後、成長ホルモン投与との組み合わせにより、糖尿病の発症をどの程度抑制できるかを検討していく。

１２　その他の成果

特になし。

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

※ホームページ等での公開（☑可・□否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。