

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300242

研究課題名（和文）生活習慣病の早期診断を目的とした新規バイオマーカーの生理的意義解明

研究課題名（英文）The study on the biological significance of novel biomarkers for the early detection of life-related diseases

研究代表者

吉田 康一（YASUKAZU YOSHIDA）

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究部門長

研究者番号：90358333

研究成果の概要（和文）：新規な酸化ストレスマーカーに関して細胞実験、動物実験を行うことにより、適応応答といった生体への良い影響があること、疾病による生成量との関連、さらにそれらの生成メカニズムなどの知見が得られた。また、ヒトによる糖負荷試験の結果、今後、糖尿病などの生活習慣病の早期の診断に有効である見通しが得られた。

研究成果の概要（英文）：We have studied the biological significance of novel biomarkers by performing cell line and animal model experiments. They can exert adaptive response under oxidative stress while they may be yielded depending on the diseases. On the other hand, it is found that some markers can be used for the early detection of diabetes by performing oral glucose tolerance test.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
平成 23 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
平成 24 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：バイオマーカー、生活習慣病、脂質、マイクロチップ、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病や神経変性疾患に関連したバイオマーカーとして、イソプロスタン（アラキドン酸酸化物群の一種）が有用なマーカーとして提唱されている。しかし、イソプロスタンは血液中濃度が微量であり、脂質過酸化反応の選択性が低い。そこで、我々の研究グループでは、生体中で豊富に存在する脂質であるリノール酸およびコレステロールのエステル体から生体内酸化反応によって生成する過酸化物やカルボニル体、アルコール体

がイソプロスタンに比べ桁違いに高く検出できることから、これらの酸化生成物群を科学的に還元・加水分解処理することによりヒドロキシリノール酸（HODE）とヒドロキシコレステロール（OHCh）とし、酸化ストレスマーカーとして提案している。

これまで、ヒト疾患患者および健常者の血液を用いたマーカー検証試験により、肝障害や糖尿病・動脈硬化症などの疾患において、これら酸化ストレスマーカーが健常者に比べて有意に高くなることが判明した。

一方、最近我々は、疾患によって生成することが認められているビタミン類の酸化生成物が、その濃度域によっては細胞応答を誘導することを明らかとした。

2. 研究の目的

提案している酸化ストレスマーカー (HODE と OHCh) がどのような生理的現象を引き起こすのか、つまり、各疾患の原因となるのか、単に疾患による炎症の結果として蓄積しているのか、生成した酸化物があらたな細胞応答を誘導するのかを明らかにする。これらの酸化ストレスマーカーの生理的意義を明確にすることで、エビデンスのあるバイオマーカーの普及を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト実証試験結果のデータプロファイリング

新規バイオマーカーの疾患ごとの血漿中濃度プロファイリングを行った。加えて、健康者を対象とした糖負荷試験を実施し、新規バイオマーカーの糖尿病等生活習慣病に対する早期診断の可能性について研究を進めた。

(2) HODE 異性体の細胞応答メカニズム解明

培養細胞 (HaCaT: ヒト表皮細胞) を用いて、HODE が細胞へどのような影響を及ぼすかを分子生物学的に調査する。HaCaT 細胞に HODE 異性体およびケトン体を処理後に過酸化水素で酸化ストレスを負荷した。生細胞数の測定は MTT 法を用いて行った。HODE 異性体による遺伝子発現の変化は DNA アレイ解析により行った。また、抗酸化システムへの影響を解析した。

(3) アルツハイマー病およびダウン症モデル動物における脳内脂質酸化とビタミン E の効果

ダウン症モデルマウス (Ts65Dn) マウスを用いて、中枢神経の酸化傷害を抗酸化物質で抑制することで、行動異常を改善することができるかを検討した。記憶能力はモリス水迷路により評価し、脳組織における脂質酸化をよび抗酸化ビタミンの摂餌の影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト実証試験結果のデータプロファイリング

新規バイオマーカーの疾患ごとの血漿中濃度プロファイリングに関しては総説として国際誌へ投稿し掲載された。一方、糖負荷試験によって、一重項酸素によって生成する空腹時 10、12-HODE が糖負荷試験 60 分後および 120 分後の血糖値と高い相関を

示し、早期診断への有用性を見出した。本知見に関しては、知財出願および国際誌 PLOS ONE への掲載を達成した。

(2) HODE 異性体の細胞応答メカニズム解明

リノール酸の酸化生成物は、酸化種によって異なることが明らかとなっている。本実験で用いた 4 種類の HODE 異性体の構造を図 1 に示した。これら 4 種類の HODE の細胞応答について検討した結果、10-ZE-HODE または 12-EZ-HODE により前処理すると、過酸化水素 (250 μ M 24 h) に対する細胞毒性に対して有意な抑制効果が認められた (図 2)。また、DNA アレイ解析の結果より、10-ZE-HODE および 12-EZ-HODE は、抗酸化防御システムに関わる転写因子である NF-E2-related factor-2 (Nrf2) に関連する遺伝子発現の上昇と Nrf2 の核内移行を誘導した (図 3)。以上の結果から HODE は異性体種によって異なる細胞応答を誘導し、その細胞保護作用には Nrf2 核内移行を介した抗酸化防御能の上昇が寄与していると示唆された。

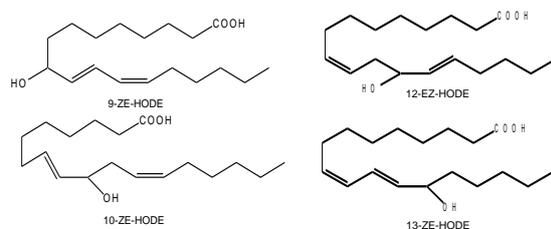


図 1 HODE 異性体の構造

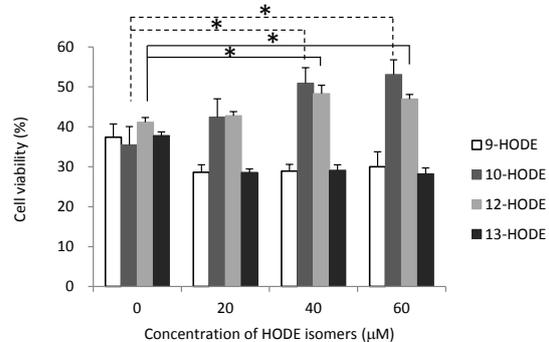


図 2 HODE による細胞保護作用

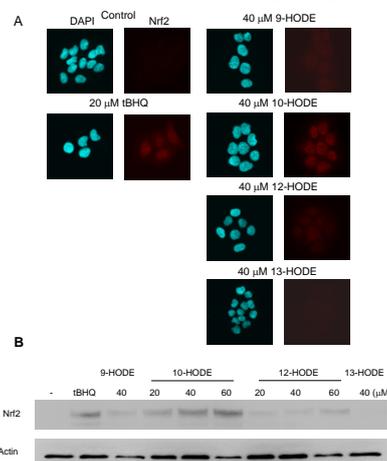


図3 Nrf2 核内移行

A: 細胞染色

B: ウェスタンブロット解析

(3) アルツハイマー病およびダウン症モデル動物における脳内脂質酸化とビタミンEの効果

Ts65Dn マウスの海馬における、脂質酸化生成物の増加と海馬神経細胞数の減少および行動異常を認めた。本マウスへ胎児期からの継続的なビタミンE(抗酸化ビタミン)投与は、ストレス環境下での行動異常に対して、改善効果を認めた(図4)。また、脳内における脂質酸化生成物を抑制(図5)と、海馬の神経細胞数を改善することを認めた。これらの結果より、脳内脂質酸化物の上昇は、神経障害による行動異常の一因になっていることが示唆された。

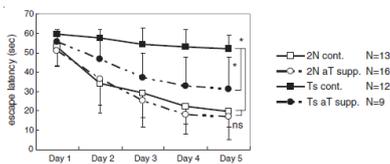


図4 抗酸化ビタミンの投与による記憶能の改善

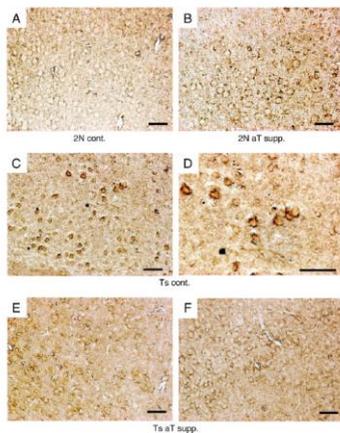


図5 Ts65Dn マウスにおける脳内脂質過酸化物の増加と抗酸化ビタミン投与による抑制効果(acroleinの組織染色)

A control マウス

B control マウス(抗酸化ビタミン摂餌)

C, D Ts65Dn マウス

E, F Ts65Dn マウス(抗酸化ビタミン摂餌)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Shichiri M, Yoshida Y, Ishida N, Hagihara Y, Iwahashi H, Tamai H, Niki E. α -Tocopherol suppresses lipid

peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. 査読有, 50(12), 2011, 1801-1811

- ② Umeno A, Shichiri M, Yoshida Y, et al. Singlet oxygen induced products of linoleates, 10- and 12-(Z, E)-hydroxyoctadecadienoic acids (HODE), can be potential biomarkers for early detection of type 2 diabetes. 査読有, PLOS ONE e63542.

- ③ Yoshida Y, Umeno A, and Shichiri M. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. 査読有, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 52, 2013, 9-16.

[学会発表] (計5件)

- ① 梅野 彩, 七里 元督, 吉田 康一他 5名、糖尿病早期診断における有用バイオマーカー群の同定(北海道)第64回日本酸化ストレス学会学術集会、2011年7月2日

- ② 七里 元督, 吉田 康一, 他 5名、' α -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairment in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome.' International symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine. (京都), 2011年1月21日

- ③ 七里 元督, 吉田 康一 他 5名「ダウン症モデル Ts65Dn マウスへの α -Tocopherol 経口投与効果の検討, 日本ビタミン学会第63回大会(広島), 2011年6月5日

- ④ 七里 元督, 吉田 康一 他 5名「ダウン症モデル Ts65Dn マウスへの α -Tocopherol 経口投与における α -Tocopherylquinone および α -Tocopheryl hydroquinone の変動」第64回日本酸化ストレス学会(北海道)、2011年7月2日

- ⑤ 七里 元督, 吉田 康一 他 5名「ダウン症モデル Ts65Dn マウスへの α -Tocopherol 経口投与効果の検討-脂質酸化生成物(hydroxyoctadecadienoic acid, 8-isoprostane)の測定による評価-」第36回日本医用マズスペクトル学会年会(大阪)2011年9月15日

[図書] (計1件)

- 梅野 彩, 吉田 康一「抗酸化とフコキサンチン」Functional Food 6巻22号2013.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：糖代謝異常の早期検出のための方法、
バイオマーカー群及び装置

発明者：梅野 彩、吉田 康一 他9名

権利者：産業技術総合研究所、徳島大学

種類：公開特許

番号：特願 2013-032954

出願年月日：2013年2月22日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田康一 (YASUKAZU YOSHIDA)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工
学研究部門・研究部門長

研究者番号：90358333

(2) 研究分担者

赤澤陽子 (YOKO AKAZAWA)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工
学研究部門・研究員

研究者番号：50549897

七里元督 (MOTOTADA SHICHIRI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工
学研究部門・主任研究員

研究者番号：20434780