

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590905

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームの向血栓性予防の新たな治療的戦略の確立

研究課題名(英文)Establishment of new strategy for preventing the prothrombotic tendency of metabolic syndrome

研究代表者

津田 博子(Hiroko, Tsuda)

中村学園大学・栄養科学部・教授

研究者番号：30180003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固制御因子プロテインS(PS)は活性化プロテインC(PC)凝固制御系の主要因子であり、その機能低下は日本人の血栓性素因として重要である。肥満女性および若年成人女性を対象とした臨床研究から、血中PS蛋白量が血中PC、ApoC と強く正に関連することが分かった。株化ヒト肝細胞HepG2のPS mRNA発現はワイン中のポリフェノールresveratrolだけでなく、培地中のグルコース濃度低下によっても低下した。以上の結果から、血中PSはVLDLやIDLに結合し、メタボリックシンドロームの向血栓性に対して防御的に機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Protein S (PS) is an anticoagulant factor that plays an important role in the protein C (PC) anticoagulant pathway, and its dysfunction is a main thrombophilia among Japanese. The clinical studies on obese women and young adult women uncovered that total PS mass concentration in plasma is positively correlated with the amounts of PC and ApoCII. The PS mRNA expression in HepG2 cells, a human hepatoma cell line, is decreased by adding resveratrol, a polyphenol present in wine, and by lowering the glucose concentration in culture medium. These results suggest that PS in plasma may bind with lipoproteins, such as VLDL and IDL, and protect the prothrombotic tendency of metabolic syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：メタボリックシンドローム 向血栓症 プロテインS プロテインC ApoC

1. 研究開始当初の背景

(1)メタボリックシンドロームでは心筋梗塞や脳梗塞などの動脈系血栓症だけでなく、深部静脈血栓症や肺血栓塞栓症などの静脈血栓塞栓症も好発する。静脈血栓塞栓症はアジア人にはまれと考えられてきたが、近年日本人にも静脈血栓塞栓症が多く発症していることが明らかになった。特に、深部静脈血栓から肺血栓塞栓症をきたすエコノミークラス症候群は死亡率が高く、注目されている。
 (2) 血液凝固制御因子プロテイン S(PS)は主に肝細胞で産生され、活性化プロテイン C(PC)による Va 因子・ a 因子の不活化を促進して血栓形成を制御する。我々は PS 遺伝子変異 (PS 徳島 K196E) による II 型 PS 欠乏症が日本人特有の血栓性素因であることを発見し、II 型 PS 欠乏症を精密かつ正確に評価できる自動分析測定法の開発を試みた。さらに、ワインや大豆製品に含まれるポリフェノールが株化ヒト肝細胞 HepG2 の PS 発現を抑制することを見出し、その転写調節機序を明らかにした。
 (3)しかし、メタボリックシンドロームにおける向血栓性の要因として、PS 機能低下について検討したものはない。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの向血栓性に対する PS の新規機能を明らかにし、食生活改善を主軸とした予防治療法の開発に向けて以下の基盤研究を行う。
 (1)肥満患者の血中 PS 動態とメタボリックシンドロームのリスクファクターや血中アディポカインとの関連の解析
 (2) 肥満患者の血中 PS 動態に影響を与える食事因子の探索と介入研究による確認
 (3) 食事因子やアディポカインによる PS 発現調節のメカニズム解明

3. 研究の方法

(1)臨床研究 -血中 PS 動態の解析-
 中村学園大学健康増進センターの研究プロジェクト「肥満の長期減量維持に必要な予測因子の抽出」(以下、「肥満クリニック」)および「若年日本人の栄養・運動能の調査と長期予後の予測に関する研究」(以下、「ヘルスチェック」)の対象者を研究対象とした。血中 PS 濃度は男性に比べて女性で低値なので、女性を対象として検討した。我々が開発した自動分析測定法により、血中総 PS 活性と総 PS 蛋白量を測定し、PS 比活性 (総 PS 活性/総 PS 蛋白量)を算定した。総 PS 蛋白量とメタボリックシンドロームのリスクファクターや血中アディポカイン、さらにエネルギー・栄養素摂取量やその他の食品の摂取量との関連を検討した。
 (2) 基礎研究 -食事因子やアディポカインによる PS 発現調節のメカニズム解明-
 株化ヒト肝細胞 HepG2 を用いて PS 発現に対する食事因子やアディポカインの影響を

real time PCR 法、Western blotting 法で検討した。

4. 研究成果

(1)臨床研究
 平成 23-24 年度は「肥満クリニック」参加の肥満女性 64 名を対象とした。PS 比活性低下例 1 名は PS 徳島変異が推定されるので除外し、残りの 63 名について解析した。血中総 PS 蛋白量は高分子量アディポネクチン、高感度 CRP やメタボリックシンドロームのリスクファクターの BMI、内臓脂肪面積、体脂肪率、血圧、血糖、HDL-コレステロールとは関連しなかったが、total PAI-1、LDL コレステロール、中性脂肪、ApoB、ApoC、ApoC、PC、フィブリノゲンと正に関連した。重回帰分析の結果、PC と ApoC のみが選択された。ApoC-II はリポタンパク質リパーゼの活性化因子であることから、血中 PS と中性脂肪代謝との関連が示唆された。さらに、食事摂取状況との関連を検討したところ、血中中性脂肪は内臓脂肪面積、エネルギー摂取量と強く正に相関したが、総 PS 蛋白量は相関しなかった。一方、総 PS 蛋白量は血中エストロジオールと強く負に相関し、閉経者が未閉経者に比べ有意に高値であったが、血中中性脂肪はエストロジオールと関連せず、閉経の有無でも差がなかった。したがって、血中 PS と中性脂肪は異なる機序で調節されることが分かった。
 そこで、平成25年度は「ヘルスチェック」参加の若年成人女性212名を対象とした。PS比活性低下例1名、データ欠損などの48名を除いた163名を対象とした。血中総PS蛋白量はBMI、高感度CRP、LDLコレステロール、ApoB、ApoC、ApoC、PC、フィブリノゲンと正に関連したが、中性脂肪、HDL-コレステロールとは関連しなかった。重回帰分析の結果、フィブリノゲン、PC、ApoC が選択された。(表1) 肥満女性と同様に若年成人女性においても、血中PSがPC、ApoC と関連することが分かった。

表1. 総PS蛋白量の予測因子(重回帰分析)

Variables	Standardized β coefficient	p
Fibrinogen	0.436	<0.001
Protein C antigen	0.277	<0.001
ApoC-II	0.182	0.009
$R^2 = 0.334$		n=163

(2)基礎研究

炎症性サイトカインの IL-6 は株化ヒト肝細胞 HepG2 の PS および PAI-1 mRNA 発現をともに上昇させたが、TNF は PAI-1 発現のみを上昇させた。ワインに含まれるポリフェノールの resveratrol は PS 発現を抑制したが、PAI-1 発現を著明に上昇させたことから、肝細胞の PS 発現は PAI-1 発現とは異なる機序で制御されていることが示唆された。Resveratrol の二量体 R3、R4 を合成し、HepG2

の PS mRNA 発現を検討したところ、R3、R4 は resveratrol の 1/10 の濃度で、PS mRNA 発現を抑制するだけでなく、PC mRNA 発現も抑制したため、血液凝固制御系を強く抑制することが示唆された。

臨床研究の結果から、PS と ApoC との関連が示唆されたので、主要なアポタンパク質の mRNA 発現解析系を確立した。Resveratrol 添加だけでなく、培地中グルコース濃度低下によっても PS 発現は低下し、PAI-1 発現は上昇したが、PC 発現には影響を与えなかった。一方、ApoC 発現は resveratrol 添加により上昇したが、グルコース濃度低下により抑制された。よって、栄養状態の変化が PS 発現に影響を与えることが分かった。

以上から、血中PSはPC、フィブリノゲン、ApoC とともにVLDLやIDLに結合して存在し、メタボリックシンドロームの向血栓性の制御に機能する可能性が示唆された。これらの研究成果は国内外の学会で発表し、一部は論文として公表した。

(3)今後の課題

当初はメタボリックシンドロームのリスクファクターの重複に伴い血中 PS が低下し、向血栓性の要因となるとの作業仮説のもとに研究を開始したが、臨床研究から血中 PS は VLDL や IDL に結合して存在し、メタボリックシンドロームの向血栓性の制御に機能することを示唆する研究成果が得られた。基礎研究からも肝細胞の PS 発現がアポタンパク質と同様に栄養状態の変化によって制御される結果が得られ、今後の研究の方向性が明確になった。栄養状態による PS 発現制御については、肝細胞だけでなく血管内皮細胞についても検討する予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Nakazono E., Miyazaki H., Abe S., Imai K., Tsuda H. (13 番目、責任著者), その他 8 名: Discontinuation of leisure time impact-loading exercise is related to reduction of a calcaneus quantitative ultrasound parameter in young adult Japanese females: a 3-year follow-up study. *Osteoporos Int.*, 査読有, 25 (2): 485-495, 2014. DOI: 10.1007/s00198-013-2416-4

Kobayashi S., Asakura K., Suga H., Sasaki S. and the Three-generation Study of Women on Diets and Health Study Group: High protein intake is associated with low prevalence of frailty among old Japanese women: a multicenter cross-sectional study. *Nutr. J.* 査読有, 12:164, 2013.

DOI: 10.1186/1475-2891-12-164

Hamasaki N, Kuma H, Tsuda H.:

Activated protein C anticoagulant system dysfunction and thrombophilia in Asia. *Ann. Lab. Med.* 査読有, 33(1):8-13, 2013.

DOI: 10.3343/alm.2013.33.1.8.

宮崎(廣戸)美絵、津田博子、石橋源次: Resveratrol の HepG2 細胞での plasminogen activator inhibitor-1 発現に与える影響. 九州共立大学総合研究所紀要. 査読無, 6: 11-14, 2013.

http://www3.kyukyo-u.ac.jp/K0001/kiyou_r6.html

津田博子、津田友秀: アジア人特有の血栓性素因 - プロテイン S 異常症-. *日本血栓止血学会誌*, 査読無, 23 (4): 379-382, 2012. <http://www.jsth.org/publications/index.html>

大西玲子、藤井弘二、津田博子、今井克己: 寝たきり要介護高齢者における体重推定式の作成. *日本老年医学会雑誌*, 査読有, 49 (6):749-751. 2012.

<http://www.jpn-geriat-soc.or.jp/publications/journal/index.html>

Tsuda T., Jin X., Tsuda H., Ieko M., Morishita E., Adachi A., Hamasaki N.: New quantitative total protein S assay system for diagnosing protein S type II: clinical application of the screening system for protein S type II deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis.*, 査読有, 23 (1): 56-63, 2012.

DOI:10.1097/MBC.0b013e32834ddefd

津田博子: 肥満とプロテイン S. *臨床検査*, 査読無, 55 (4): 403-406, 2011.

<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=54>

Hiroto Y., Tadokoro K., Tsuda T., Nakazono E., Ohnaka K., Takayanagi R., Hamasaki N., Tsuda H.: Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine, down-regulates protein S expression in HepG2 cells. *Thromb. Res.* 127: e1-e7, 2011.

DOI 10.1016/j.thromres.2010.09.010

[学会発表](計 22 件)

Tsuda H., Nakazono E., Sata S., Kishi A., Matsukawa T., Ohnuki K.: Resveratrol and its dimers down-regulate protein S mRNA expression in HepG2 cells. XXIV Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Amsterdam, The Netherlands, July 2, 2013.

Jin X., Tsuda T., Tsuda H., Hamasaki N.: An improved screening system for protein S type II deficiency: expanded versatility of total protein S activity assay. XXIV Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Amsterdam, The Netherlands, July 1, 2013.

Tsuda H. : Racial differences in genetic risk factors for venous thromboembolism. "Plasma coagulation inhibitors", 59th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Amsterdam, The Netherlands, June 29, 2013. (Invited lecture)

Nakazono E., Tsuda H. (13 番目) その他 11 名: Discontinuation of impact-loading exercise is related to reduction of a calcaneus quantitative ultrasound parameter in young adult Japanese females: a 3-year follow-up study. 2nd Joint Meeting of the Int. Bone & Mineral Soc. and the Japanese Soc. for Bone & Mineral Res., Kobe, May 31, 2013.

Ueno H., Tsuda H. (7 番目) その他 14 名: Charting of daily weight pattern introduced into group therapy reinforces the synergistic effect on weight reduction in obese patients. 16th Int. Congr. Dietetics, Sydney, Australia, September 6, 2012.

中園栄里、津田博子: 女子大学生の入学後の骨量減少には運動の中止が関与する - 3年間の追跡調査 - 第 10 回大連合大会(第 34 回日本臨床栄養学会総会、第 33 回日本臨床栄養協会総会)、10 月 7 日 2012 年

津田博子、今井克己: 臨床検査としての食事調査の標準化(現行評価法の比較検討) - その 2 - 第 10 回大連合大会(第 34 回日本臨床栄養学会総会、第 33 回日本臨床栄養協会総会) シンポジウム「食の評価、臨床栄養の評価」, 東京、10 月 6 日 2012 年(招待講演)

Tsuda H., Kobayashi T., Tsuda T.: Total protein S assay system: Clinical significance and pre-analytical quality control. "Plasma coagulation inhibitors", 58th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Liverpool, UK, June 28, 2012. (Invited lecture)

植田麻衣子、中園栄里、津田友秀、金秀日、中野修治、津田博子: 肥満女性における血液凝固制御因子プロテイン S の血中動態の解析. 第 34 回日本血栓止血学会学術集会、東京、6 月 8 日 2012 年

津田博子: アジア人特有の血栓性素因プロテイン S 異常症 - 新しい診断法の開発 - 第 34 回日本血栓止血学会学術集会、ランチョンセミナー、東京、6 月 9 日 2012 年(招待講演)

津田博子、濱崎直孝: アジア人特有の血栓性素因 - プロテイン S 異常症 - 第 6 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 シンポジウム血栓性素因部会「新しいプロテイン S 活性測定法の開発」, 東京、1 月 21 日 2012 年 (招待講演)

上野宏美、津田博子 (7 番目)、その他 14

名: 食行動の領域別解析からみた女性肥満症患者の摂取内容と代謝異常の関連. 第 11 回日本病態栄養学会総会、京都、1 月 15 日 2012 年

津田博子、今井克己: 臨床検査としての食事調査の標準化(現行評価法の比較検討)第 9 回大連合大会(第 33 回日本臨床栄養学会総会、第 32 回日本臨床栄養協会総会) シンポジウム「食の評価」, 東京、10 月 29 日 2011 年(招待講演)

津田博子: 最近の葉酸研究 - 生活習慣病との関連 - 第 30 回日本思春期学会学術集会、ランチョンセミナー、福岡、9 月 27 日 2011 年 (招待講演)

Tsuda H., Hiroto Y., Tadokoro K., Tsuda T., Nakazono E., Ohnaka K., Takayanagi R., Hamasaki N.: Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine, down-regulates protein S expression in HepG2 cells. XXIII Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Kyoto, July 28, 2011.

Jin X., Tsuda T., Tsuda H., Ikeo M., Adachi T., Hamasaki N.: Development of A New Quantitative Total Protein S Assay System for Screening of Protein S Type II deficiency. XXIII Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Kyoto, July 27, 2011.

Ueda M., Nakazono E., Tsuda T., Jin X., Nakano S., Tsuda H.: Plasma concentrations of total protein S antigen are not related with body fat mass but with triglyceride levels in obese Japanese women. XXIII Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Kyoto, July 27, 2011.

Tsuda T., Jin X., Tsuda H., Morishita E., Kobayashi T., Hamasaki N.: Evaluation of a novel total Protein S assay system for screening of protein S type II deficiency, "Plasma coagulation inhibitors", 57th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Kyoto, July 27, 2011.

Tsuda H.: Evaluation of a novel total Protein S assay system for screening of protein S type II deficiency, "Plasma coagulation inhibitors", 57th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Kyoto, July 23, 2011. (Invited lecture)

Tsuda T., Jin X., Tsuda H., Hamasaki N.: New Quantitative Total Protein S Assay System for Diagnosing of Protein S type II Deficiency. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Berlin, Germany, May 16, 2011.

21 Tsuda H., Morishita E., Kobayashi T., Tsuda

T., Jin X., Hamasaki N.: A Clinical Application of the Screening System for Protein S type II Deficiency. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Berlin, Germany, May 16, 2011.

- 22 宮崎瞳、津田博子 (7 番目)、その他 14 名:
肥満女性の血中アディポネクチン濃度
と体脂肪量、血中因子および食事因子の
関連性-閉経前後での検討-。第 65 回日
本栄養・食糧学会大会、東京、5 月 14
日 2011 年

〔図書〕(計 4 件)

津田博子: 第 3 章 臨床検査、第 3 部 臨床
検査値の読み方(田中明、加藤昌彦、津田
博子編: N S T のための疾患診断・治療と
臨床検査の基礎知識) 建帛社, pp.27-31,
pp.41-42, pp.124-141/pp.149(3.31.2014
出版)

津田博子: 第 8 章 成人期(戸谷誠之、伊
藤節子、渡邊令子編: 応用栄養学 [改訂
第 4 版]) 南江堂, pp.209-250/pp.388
(9.25.2012 出版)

津田博子: 第 1 章 疾患診断の概要、付表
主要臨床検査基準値(田中明、加藤昌彦編:
N ブックス・疾病の成り立ち: 臨床医学)
建帛社, pp.5-17, pp.191-195/pp.201
(3.30.2012 出版)

津田博子: 第 1 章 栄養ケア・マネジメン
ト 第 1~3 節、第 7 章 高齢期の栄養(江
澤郁子、津田博子編: N ブックス・三訂
応用栄養学) 建帛社, pp.1-14,
pp.179-200/pp.253(8.31.2011 出版)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 博子 (TSUDA, Hiroko)
中村学園大学・栄養科学部・教授
研究者番号: 3 0 1 8 0 0 0 3

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし