

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号	84305
研究種目	若手研究 (B)
研究期間	2011~2012
課題番号	23700821
研究課題名 (和文)	摂取栄養素とアディポサイトカイン値に基づく肥満症の効果的な栄養指導の確立
研究課題名 (英文)	Establishment of the effective Nutrition Guidance for obese Patients based on Nutritional Intake and levels of Adipocytokine Levels.
研究代表者	山陰 一 (Hajime Yamakage) 独立行政法人国立病院機構 (京都医療センター臨床研究センター) 糖尿病研究部・研究員
研究者番号	40598900

## 研究成果の概要 (和文) :

本研究では、下記の事項について成果が得られた。

- 1、エイコサペンタエン酸 (EPA) の投与により、アディポネクチンや単球中 IL-10 発現の上昇、心血管病リスク指標の改善を認めた。また、他の脂肪酸分画に比べ、EPA/アラキドン酸比の変化量が心血管病リスク指標の改善と強い関連性を持つことを認めた。更に細胞実験において、EPA の PPAR $\gamma$  を介した単球の質的改善作用が CVD 予防に寄与する可能性を示した。
  - 2、大豆イソフラボン・エクオール投与により、血糖、LDL-C や CAVI の改善効果を認めた。
- 以上より、各栄養素の新しい機能性に立脚した食生活指針の提案が可能となり、CVD 予防の為に新しい機能性食品の開発に繋がる可能性がある。

## 研究成果の概要 (英文) :

1. EPA treatment significantly increased serum adiponectin and IL-10 expression in monocytes, and improved cardiovascular risk factors including CAVI. In addition, the changes of EPA/AA ratio after EPA treatment had a stronger association with the improvement of CVD risk factors, relative to the ratio of other serum fatty acids. Furthermore, in vitro study, we showed that EPA exert the favorable effect of the quality of monocyte function through the activation of PPAR $\gamma$ .
  2. Treatment with a natural S-equol supplement, one of soy isoflavones, had a significant effect on improving fasting plasma glucose, LDL-C and CAVI, an index of arterial index.
- Therefore, this study will enable to provide a new dietary guideline based on the new functionality of each nutrient and may lead to the development of new functional foods for the prevention of CVD.

## 交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野: 総合領域

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: 栄養指導、肥満、メタボリック症候群、脂肪酸

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

内臓肥満を基盤としたメタボリック症候群 (MetS) は心血管病 (CVD) の高リスク群であり、CVD 予防の為に積極的な栄養指導が医療経済的・社会的に急務である。

脂肪酸には飽和と不飽和脂肪酸があるが、近年、飽和脂肪酸やトランス型脂肪酸の摂取過多が、CVD リスクを上昇させると報告された (N. Engl. J. Med., 1997)。飽和脂肪酸を含む遊離脂肪酸は、骨格筋のインスリン抵抗性や膵島β細胞での脂肪毒性をもたらす。内臓脂肪由来の遊離脂肪酸は門脈を介して直接肝臓に流入し、インスリン抵抗性や脂肪肝・非アルコール性脂肪肝炎の発症に関与する (J Clin Invest, 2000, Cell Metab, 2005)。一方、不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸の炎症惹起作用を減弱しうる。

多くの疫学研究から魚油やω3系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の CVD 予防効果が示されている。最近、大規模研究 JELIS にてω3 PUFA であるエイコサペンタエン酸 (EPA) による CVD 発症抑制効果が報告された (Lancet. 369, 2007)。近年、単に脂質の量 (LDL-C 値) を低下させるだけでは CVD 予防は不完全であると言われ、脂質の質の改善が注目されている。申請者らは既に肥満・MetS において、EPA 投与による動脈硬化惹起性リポ蛋白 small dense LDL, 酸化 LDL, 接着因子や炎症・動脈硬化指標 (PWV) の改善や、アディポネクチンの上昇を認め (Diabetes Care 30, 2007, Arterioscler Thromb Vasc Biol 28, 2008, Hypertens Res 32, 2009)、脂質の質の重要性を報告している。反対にω6 PUFA・アラキドン酸 (AA) は血小板凝集能を上げ、動脈硬化を惹起する。最近、AA/EPA 比が冠動脈プラーク数と相関があること (Circ J. 72, 2008)、EPA/AA 比が高いほど突然心臓死や心筋梗塞の発症リスクが低下することが報告された (Circ J. 73, 2009)。

以上、CVD 予防には脂肪総摂取量のみならず、脂肪の質・脂肪酸分画 (飽和/不飽和脂肪酸比や EPA/AA 比) に着目した脂質管理が有効と考えられるが、是までに十分な EBM や摂取脂質に応じた栄養指導・指針は確立されていない。

また摂取食品中、大豆はイソフラボンを多く含み、エストロゲン様作用、抗アンドロゲン作用、抗酸化作用を有し、糖代謝・インスリン感受性・動脈硬化に対して良い効果を発揮すると報告された (NEJM 1995, Diabetes Care 2002, JCEM 2003)。最近、大規模疫学調査により、日本人女性では大豆摂取量が多いほど脳梗塞や心筋梗塞の発症リスクが軽

減されることが報告された (Circulation 116, 2007)。申請者らも、肥満・MetS の栄養調査により大豆摂取の低下が肥満や低アディポネクチン血症に影響する可能性を報告した (肥満研究 15 Suppl. p. 174, 2009)。

また、大豆イソフラボンのダイゼインから腸内細菌の代謝により変換されるエクオールは、エストロゲン様作用を有し、大豆摂取の感受性の違いに腸内細菌によるエクオールの産生の有無が関与する可能性がある。しかし、是まで大豆やイソフラボンの研究ではこの点が全く考慮されていない。

申請者らは、最近肥満者ではエクオール産生菌を持つ人が一般人より低率であり、エクオール産生能が肥満・MetS の形成に関与する可能性を報告した (肥満研究 16 Suppl. p. 123, 2010)。

申請者は、既に肥満外来にて簡易食物摂取調査票を用い摂取栄養素を調査し、脂質や大豆以外にも炭水化物・穀類・肉類等各栄養素の摂取状況と肥満・MetS 病態との関連を検討している。既に肥満症/MetS データベースを構築し、アディポサイトカインや PWV 等の臨床意義 (Diabetes Care 27, 2004) や減量や EPA 等の治療効果 (Diabetes Care 30, 2007) を報告した。

未だに脂肪酸含め各栄養素の機能的意義には不明な点が多く、今回基礎的な作用機序の検討により極めて独創的な研究成果が期待される。本研究により、各栄養素の新しい機能性に立脚した健康的な食生活の指針の提案が可能となり、新しい機能性食品の開発に繋がる可能性がある。

以上、食生活・生活習慣改善に対する国民の関心を高め、MetS・CVD の予防医学に新しい洞察を与えられ、健康寿命の延伸と高齢化社会の QOL 改善や医療費抑制に貢献することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、急増する肥満や代謝症候群 (MetS) において、肥満症コホートを基盤に簡易食物摂取調査票と脂質代謝・脂肪細胞由来ホルモン・心血管病リスクの定期的測定により、「摂取栄養素とアディポサイトカインに基づいた肥満症・MetS の効果的なオーダーメイド栄養指導の確立」を目指す。特に、脂質管理に関しては、脂肪総摂取量のみならず、脂質の質・脂肪酸分画 (EPA/AA 比等) に着目した CVD 予防の為に栄養指導の確立を目指す。また、エクオール産生の有無やエクオール投与による CVD 発症予防効果を検討し、エクオールの有無・濃度に着目した大豆製品の摂取

指導・栄養指導を考案する。

以上、多数の肥満症例で各栄養素の摂取量・率とアディポサイトカインとの関連を詳細に検討し、アディポサイトカイン分泌異常を惹起する栄養素の摂取パターンを解析し、各栄養素の摂取率別の至適栄養指導プログラムの確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1)

肥満症 116 例における、高脂血症合併の有無別の体組成・脂質代謝パラメータ・アディポサイトカイン・動脈硬化指標 baPWV、及び血中 IL-10、末梢血単球の炎症惹起タイプ (M1) : TNF $\alpha$ ・IL-6 と抗炎症タイプ (M2) : IL-10、CD163/CD14 の比較を行った。

#### (2)

肥満症例 82 例を対象に、食事療法のみの対照群と、EPA 投与群 (1.8g/day) との 2 群に無作為に割り付けを行い、EPA、脂質パラメータ、PWV、血中 IL-10、単球中 M1/M2 マーカーの変化について比較試験を施行した。

#### (3)

THP-1 細胞において EPA 投与 24、48 時間投与後 IL-10 の発現・分泌を検討した。更に、EPA による発現上昇の機序を明確にするために、PPAR $\alpha$ ・ $\gamma$  の阻害剤・siRNA を用いて、Luciferase assay 及び ChIP assay による検討を行った。

#### (4)

他の脂肪酸分画 (ドコサヘキサエン酸 [DHA]、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (DGLA)) についても注目し検討を行った。肥満患者 88 例を、食事療法のみの対照群と、EPA 投与群との 2 群に無作為に割り付け、EPA、脂質パラメータ、CAVI、脂肪酸 4 分画の変化について比較試験を施行した。

#### (5)

肥満症・MetS54 例においてエクオール<sup>®</sup>の産生の有無を明確にした上で、2 群無作為割り付けにて、エクオール 10mg/日またはプラセボを各 3 週間投与するクロスオーバー試験を行う。

エクオールの摂取が肥満症・MetS 及び心血管合併症の進展、予防に有効か否かを検討する。

### 4. 研究成果

#### (1)

肥満症 116 例 (男性 64 例、女性 52 例、平均年齢 50.9 歳) において、高脂血症合併群 90 例 (男性 53 例、女性 37 例) では、非合併

群 26 例 (男性 11 例、女性 15 例) より、中性脂肪が有意に高値、HDL-C が低値であった。一方、EPA 及び EPA/AA 比には有意な群間差は認められなかった。また、高脂血症合併群では、アディポネクチン、血中 IL-10 が有意に低値であることが認められた (アディポネクチン: 非合併群, 8.2 [ $\mu$ g/ml]; 合併群, 6.0;  $P < 0.05$ . 血中 IL-10: 非合併群, 5.6 [pg/ml]; 合併群, 4.8;  $P < 0.05$ .). 更に、単球中 M2 マーカー・IL-10 の発現が有意に低値であることが認められた (非合併群: 6.6 [arbitrary unit], 合併群: 4.4,  $P < 0.05$ ) (Diabetes Care 35, 2012)。

#### (2)

肥満症 43 例において、EPA の 3 ヶ月投与により、コントロール (通常治療) 群に比べ、中性脂肪と baPWV の低下、EPA、アディポネクチンや血中及び単球中 IL-10 の有意な発現の上昇を認めた (TG: 2.3  $\rightarrow$  1.7 [mg/dl]; baPWV: 1476  $\rightarrow$  1406 [cm/sec]; EPA: 51  $\rightarrow$  110 [ $\mu$ g/ml]; アディポネクチン: 6.1  $\rightarrow$  6.6 [ $\mu$ g/ml]; 血中 IL-10: 5.2  $\rightarrow$  6.2 [pg/ml]; 単球中 IL-10: 5.5  $\rightarrow$  10.0 [au].  $P < 0.05$ ).

また、年齢、性別、初期血圧、初期 PWV 値を調整した相関分析により、EPA による PWV 改善には単球中 IL-10 とアディポネクチンの上昇が関連していることが認められた ( $\nabla$ アディポネクチン:  $r = -0.35$ ;  $\nabla$ 単球中 IL-10:  $r = -0.26$ ;  $P < 0.05$ ).

更に、EPA 投与後の EPA/AA 比の分布は、投与後の血中及び単球中 IL-10 と有意な正の相関を持つことが認められた (血中 IL-10:  $r = 0.361$ ; 単球中 IL-10:  $r = 0.265$ ;  $P < 0.05$ ) (Diabetes Care 35, 2012)。

#### (3)

THP-1 細胞において EPA 投与による IL-10 の有意な上昇を認めた。また、IL-10 上昇は PPAR $\alpha$  ではなく PPAR $\gamma$  を介することが認められた。更に、Luciferase Assay の結果から IL-10 発現上昇には、IL-10 のプロモーター領域の PPRE 配列が必要であり、ChIP Assay から EPA が PPAR $\gamma$  の IL-10 プロモーターの PPRE 領域への結合を増加させ、IL-10 発現を上昇する事を証明し、EPA による PPAR $\gamma$  を介した単球 M1/M2 タイプの質的改善作用が CVD 予防に寄与する可能性を報告した (Diabetes Care 35, 2012)。

#### (4)

他の脂肪酸分画 (ドコサヘキサエン酸 [DHA]、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (DGLA)) についても注目し検討を行った。高脂血症合併肥満症 44 例において、EPA の 3 ヶ月投与により、コントロール (通常治療) 群に比べ、EPA/AA

比の上昇、及び DGLA/AA 比の有意な低下が認められた。また、アディポネクチンの有意な上昇、高感度 CRP 及び CAVI の有意な低下を認めた。DHA/AA 比や DGLA/AA 比に比べ、EPA/AA 比の変化量が心血管病リスク指標 CAVI の改善と強い関連性を認めており、ステップワイズ重回帰分析において、CAVI の低下に有意に影響しているのは、EPA/AA 比の上昇、TG の低下、高感度 CRP の低下の 3 因子であった(現在 J Atheroscler Thromb 投稿中)。

(5)

肥満症 54 例におけるエクオール産生者は 17 例 (31.5%) であり、一般人の報告より低率であった。エストロゲン様作用を有する大豆イソフラボン・エクオールの効果を検討した所、エクオールによる血糖、LDL-C や CAVI の改善効果が認められ、特に女性のエクオールノンプロデューサでその改善効果が顕著であることが認められた。また、エクオール投与による LDL-C の低下と CAVI の低下に有意な正相関が認められた。(r=0.326, P < 0.05)。(Clin Endocrinol 78, 2012)。肥満症ではエクオール非産生者の割合が一般人より高く、特にエクオール非産生者である女性に対するエクオール投与により LDL-C の低下と CAVI の改善が認められ、肥満・MetS におけるエクオールの心血管病発症予防効果が示唆された。

以上、本研究により、各栄養素の新しい機能性に立脚した健康的な食生活の指針の提案が可能となり、CVD 予防の為の新しい機能性食品の開発に繋がる可能性がある。

#### 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 4 件)

- 1) Usui T, Tochiya M, Sasaki Y, Muranaka K, Yamakage H, Himeno A, Shimatsu A, Inaguma A, Ueno T, Uchiyama S, Satoh-Asahara N. Effects of natural S-equol supplements on overweight or obesity and metabolic syndrome in the Japanese, based on sex and equol status. Clin Endocrinol (Oxf) 78:365-372, 2012, 査読有, DOI:10.1111/j.1365-2265.2012.04400.x.
- 2) Kotani K, Satoh-Asahara N, Kato Y, Araki R, Himeno A, Yamakage H, Koyama K, Tanabe T, Oishi M, Okajima T, Shimatsu A, The Japan Obesity Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group.

Remnant-like particle cholesterol and serum amyloid A-low density lipoprotein levels in obese subjects with metabolic syndrome. J Clin Lipidol 5:395-400, 2011, 査読有, DOI:10.1016/j.jacl.2011.08.001.

- 3) Kotani K, Satoh-Asahara N, Kato Y, Araki R, Himeno A, Yamakage H, Koyama K, Tanabe T, Oishi M, Okajima T, Shimatsu A, The Japan Obesity Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group. Serum Amyloid A Low-density Lipoprotein Levels and Smoking Status in Obese Japanese Patients. J Int Med Res 39: 1917-1922, 2011, 査読有, DOI: 10.1177/147323001103900536.

[学会発表] (計 15 件)

- 1) 片山蘭、村中和哉、佐々木洋介、山陰一、真鍋悟、山地聡子、内川巖志、三浦あゆみ、後沙苗、安藤由美、谷川清、浅原哲子。当院における外来患者向け体験型食事教育「メタボランチ」を通して。第 66 回国立病院総合医学会, 2012 年 11 月 16 日-2012 年 11 月 17 日, 兵庫。
- 2) 山陰一、佐々木洋介、村中和哉、塚原徹也、浅原哲子。頸動脈プラークの M1/M2 マクロファージ浸潤と炎症性サイトカインに対する肥満・糖尿病の影響。第 33 回日本肥満学会, 2012 年 10 月 11 日-2012 年 10 月 12 日, 京都。
- 3) 佐々木洋介、浅原哲子、村中和哉、山陰二、後藤伸子、勝浦五郎、中尾一和、島津章。高脂肪食誘発肥満モデルマウスにおける GLP-1 受容体のエネルギー代謝調節作用。第 33 回日本肥満学会, 2012 年 10 月 11 日-2012 年 10 月 12 日, 京都。
- 4) Satoh-Asahara N, Sasaki Y, Muranaka K, Yamakage H, Wada H, Hasegawa K, Shimatsu S. Anti-inflammatory Effects of Eicosapentaenoic Acid in Metabolic Syndrome-Increase in Interleukin-10 Levels of Peripheral Blood Monocytes through a PPAR $\gamma$  dependent pathway. The 44th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society, 2012 年 7 月 19 日-2012 年 7 月 20 日, 京都。
- 5) 浅原哲子、佐々木洋介、椽谷真由、村中和哉、山陰一、河野茂夫、和田啓道、長谷川浩二、島津章。メタボリック症候群における EPA の抗動脈硬化作用の分子機構-単球・マクロファージ PPAR $\gamma$  を介する IL-10 の上昇作用-。第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012 年 5 月 17 日-2012 年 5 月 19 日, 東京。
- 6) Takanabe-Mori R, Ono K, Wada H, Takaya

T, Yamakage H, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Takahashi Y, Fujita M, Fujita Y, Sawamura T, Hasegawa K. Soluble LOX-1 and LOX Index in Sera of Smoking Patients are Closely Associated with Highly Sensitive CRP and Expired Air Carbon Monoxide Concentrations. American Heart Association Scientific Sessions 2011, 2011年11月12日-2011年11月16日, Florida, USA.

- 7) 浅原哲子、佐々木洋介、椽谷真由、姫野亜紀裕、村中和哉、山陰一、小鳥真司、河野茂夫、和田啓道、長谷川浩二、島津章。脂質代謝異常合併肥満症におけるEPAによる末梢血単球 M1/M2 タイプへの影響と抗動脈硬化作用。第 32 回日本肥満学会, 2011年9月23日-2011年9月24日, 兵庫。
- 8) 井口梓、山陰一、椽谷真由、村中和哉、佐々木洋介、島津章、河野茂夫、浅原哲子。肥満・メタボリック症候群における睡眠時無呼吸症候群の重症度と心血管リスクとの関連。第 32 回日本肥満学会, 2011年9月23日-2011年9月24日, 兵庫。
- 9) 佐々木洋介、浅原哲子、村中和哉、椽谷真由、姫野亜紀裕、山陰一、河野茂夫、島津章。肥満・2型糖尿病患者における末梢血単球 M1/M2 タイプに対するピオグリタゾンの効果。第 32 回日本肥満学会, 2011年9月23日-2011年9月24日, 兵庫。
- 10) 浅原哲子、佐々木洋介、椽谷真由、姫野亜紀裕、村中和哉、山陰一、河野茂夫、島津章。肥満・メタボリック症候群におけるエイコサペンタエン酸による末梢血単球 M1/M2 タイプへの影響と抗動脈硬化作用。第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011年5月19日-2011年5月21日, 北海道。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山陰 一 (Hajime Yamakage)  
独立行政法人国立病院機構 (京都医療センター 臨床研究センター) 糖尿病研究部・研究員  
研究者番号: 40598900

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

佐藤 哲子 (Noriko Satoh)  
独立行政法人国立病院機構 (京都医療セン

ター臨床研究センター) 糖尿病研究部・臨床代謝栄養研究室長  
研究者番号: 80373512

小谷 和彦 (Kazuhiko Kotani)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60335510

森崎 隆幸 (Takayuki Morisaki)  
国立循環器病研究センター研究所・分子生物学部・部長  
研究者番号: 30174410