

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380071

研究課題名(和文) ラット系統を用いた脂質代謝異常の血中バイオマーカの探索と妥当性の検証

研究課題名(英文) Validation for adequacy of serum biomarker in rat population

研究代表者

佐藤 匡央 (Sato, Masao)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90294909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食事性高コレステロール血症を引き起こす、系統を通常系統と掛け合わせ、第二世代を兄妹交雑で作り出し、親世代の変化が、第二世代にどのように伝わるかを血清中のリン脂質脂肪酸で検討した。その結果、肥満のモニターバイオマーカである、ジホモ-リノレイン酸の値は体重増加に伴って高くなり、DHAは低くなる。しかし、ジホモ-リノレイン酸の値は連鎖解析の結果、遺伝子は同定されないが、DHAはその合成酵素である遺伝子の変が発見された。これらの結論から、血清の脂肪酸組成は、遺伝的変異が原因である変化と、環境要因である変化が見られることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, EXHC rats mated with BN rats. In the generation 2, F2, serum dihomog-linoeinic acid and DHA levels linked to body weight gain. However, the dihomog-linoeinic acid levels did not relate to a gene mutation by linkage analysis. The DHA levels related to a mutation in a gene. Therefore, serum fatty acid composition as a biomarker in a population may divide into two groups of life style-related and mutation related fatty acids.

研究分野：栄養化学

キーワード：脂肪酸 酸化コレステロール バイオマーカ 連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症への危険を予知させる有用なバイオマーカーである血清コレステロール濃度の上昇には個人差があり、それには様々な遺伝子の変異が関係している。申請者は、SD系ラットから交雑により単離され、コレステロールを摂取させると速やかに血清コレステロール濃度が上昇する外因性高コレステロール血症(ExHC)ラットを維持している。このラットの高コレステロール血症は肝臓から分泌される超低密度リポタンパク質(VLDL)の異化がより遅いことに基づいていることを見いだした。そして、この異化速度の減少は、肝臓で合成されるVLDLのトリアシルグリセロール含量が少なく異化され難い組成であることに原因があった。そこで2002年にラットのゲノム全配列決定のプロジェクトにより発表されたマイクロサテライトマーカーを用いて、ラットゲノム全体を網羅的に解析する方法である。他系統との交雑により作出したF2世代の連鎖解析により、食事による血清コレステロール濃度を上昇させる領域として染色体5番および14番の領域に可能性があることが明らかになった(M Asahina et al., 2005, Genetic analysis of diet-induced hypercholesterolemia in exogenously hypercholesterolemic rats, *J Lipid Res.*, 46(10), 2289-2294)。この解析の詳細では性により血清コレステロール値を決定している領域が分離しており、連鎖解析手法を用いた遺伝子同定結果においては非常にまれな結果であった。雄においての14番の領域にはRGD1309450\_predictedの遺伝子のcording regionにmRNAが短くなる変異が存在し、この遺伝子はヒトおよびマウスで発現しているSMEK2と相同性が高い。また、雌において血清コレステロール量を制御する領域は染色体5番に存在し、ホモコンジェニック系統で、約33Mbpまでに限局化している。本年度中に同定できる予定である。

一方で、申請者は疾病対応型バイオマーカー群としてヒト血清中の病態に関連する酸化コレステロールの完全同定・定量も行っている。現在のところ、質量分析計のチャートにあるヒト血清中の酸化コレステロールの分子種を同定し、同時にガスクロマトグラフィ質量分析計(GC/EI-MS)で定量を行っている。酸化コレステロールの定量はヒト・マウス・ラットで分子種の変化はなく、量的変化が確認されている。血中酸化コレステロールは現在まで、脂質代謝、アルツハイマー病(27-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol:以下酸化コレステロール名は27-OHおよび24(S)-OHのように示す: Prasanthi JR et al., 2009, Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurodegener.*, 4, 1-8)、脂肪肝(4-OH、7

-OH)、肺疾患(6-keto-5-OH: M Plufer et al., 2005, Ozone Exposure in Vivo and Formation of Biologically Active Oxysterols in the Lung. *JPET.*, 312(1), 256-264)など、さまざまな疾病との関連が示唆されている。

ExHCラットは高コレステロール血症を示し、同時に高い肝臓コレステロール値も示す。したがって、体内での酸化コレステロールおよびステロイド産生の基質濃度は高いこととなり、血中から新規ステロイドの探索が容易になると考えられる。ExHCラットは高コレステロール血症以外にもNBRP Rat Phenome Databaseからのデータによれば、逃避試験(Passive avoidance training)の結果も悪くなっている(BN/Seacラット:9.9秒、ExHC/Taラット:48.3秒、全ラット系統平均:28.5秒)。つまり、ExHCラットでは脳の発達が悪い可能性がある。これを利用した、脳重量・学習能の発達に関連する遺伝子の同定は行われていない。これまで行ってきた飼育において、対照系統であるBNラットと比較して、ExHCラットはすべての白色脂肪組織(WAT)の重量が有意に増加し、また、低肝臓トリグリセリド量および低インスリン応答という表現型をもっている。つまり、ExHCラットは低学習能、肥満、脂肪肝抵抗性、糖尿病の表現型をもつ。これらの疾病は脂質代謝異常が関連し、とくに分子機構として肥満・脂肪肝の発症において酸化コレステロールは核内レセプター(LXR, ER)などのアゴニスト・アンタゴニストとなり、内分泌攪乱様作用を発揮することが示唆されている。

さらに、疫学的なデータと遺伝的素因の解析は直接的な一次バイオマーカー(表現型および生化学的検査項目)で検証され、より精度の高い二次バイオマーカー(一次バイオマーカーの存在形態およびその代謝物)は、病態発症機構の解明に重要な知見を与えている。例えば、動脈硬化症発症において血清総コレステロール濃度(一次) HDLおよびLDLコレステロール濃度(二次) small dense LDLコレステロール濃度(三次)、または糖尿病発症において、血糖値(一次) HOMA-IRおよびヘモグロビンA1c(二次)である。しかし、このバイオマーカーの発見上、遺伝的素因を考慮したモデル集団での検討はない。

さらに、ExHCラットは全ゲノムDNA配列データのデータベース化を完了した。対照系統であるBN系ラットはデータベースがWeb上にあり、利用できる。この2系統を掛け合わせたF1さらにF2世代を、遺伝的多様性をもつ集団と考え、前述した高コレステロール血症を規範として上記の表現型と一次バイオマーカー(脳容量・体脂肪率・血清総コレステロール濃度等)、二次バイオマーカー(酸化コレステロール等のステロイド代謝物および血中脂質の脂肪酸組成)の妥当性を検証することができるとの着想に至った。

2. 研究の目的

モデル動物同士の交配による遺伝的に解析可能な交雑集団における一次的・二次的バイオマーカの動態とその妥当性を、すでに遺伝子同定の終了している高コレステロール血症原因遺伝子の挙動を参照しながら、新規バイオマーカである血清酸化コレステロール濃度と脂質代謝異常症との対応、さらに新規なバイオマーカステロイド分子を探索し、バイオマーカとして集団内挙動を同時に検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ExHC ラットに BN ラットをかけあわせ、F1 世代をつくる。しかし、この際、ミトコンドリアは雌性側の遺伝子をもつことになるので、交雑は ExHC( )×BN( )と BN( )×ExHC( )の両系統の F1 世代をつくる(以降、かけあわせの順は の順)。F2 世代は F1(ExHC×BN)と F1(BN×ExHC)のそれぞれの中でのランダム交雑と F1(ExHC×BN)×F1(BN×ExHC)の 2 集団のランダム交雑を行い、F2 世代を 3 集団をつくることを開始する。この 3 集団内の個体は各 200 匹ずつとする。個体数の根拠は一形質が二遺伝子以下で決定される場合、一遺伝子型で 10 匹確保すると、160 匹となることである。この集団を 3 年間にわたって作製し、表現型の評価のため、血清・臓器を保存する。さらにマイクロサテライトマーカを用いて各個体の遺伝様式をマッピングする。

血清の酸化コレステロール濃度は未同定の 1 種を除いて 12 種類の同定が終了し、定量法も確立している。この方法で定量を行う場合、血清のサンプリング量は 200 μl しか必要としない。前述の計画方法 1 でできた集団{親(P)・子(F1)・孫(F2)}においてまず、血清酸化コレステロール・血中脂質濃度(リン脂質・遊離脂肪酸・コレステロールエステル)を測定する。また、同様にそれぞれの脂肪酸組成を測定する。現在、血清脂肪酸組成はメタボリックシンドロームバイオマーカとしての地位を確立しつつあるが(C Maruyama et al., 2008, Differences in Serum Phospholipid Fatty Acid Compositions and Estimated Desaturase Activities between Japanese Men with and without Metabolic Syndrome, J Atheroscler Thromb. 15(6):306 - 313)、その際、desaturation index(不飽和化指標)も計算されている。しかし、血清のどの脂質の脂肪酸組成が生体の不飽和化反応と関連があるのかは報告がなく、総括して議論されているので、この集団と、不飽和化酵素の抗体を用いて、肝臓中の 9-desaturase(SCD-1)、6-desaturase および 5-desaturase タンパク質量および mRNA 量を測定し、肝臓内の脂肪酸組成と照らし合わせて考察を行う。

### 4. 研究成果

本研究では、食事性高コレステロール血症を引き起こす、系統を通常系統と掛け合わせ、第二世代を兄妹交雑で作り出し、親世代の変

化が、第二世代にどのように伝わるかを血清中のリン脂質脂肪酸で検討した。その結果、肥満のモニターバイオマーカである、ジホモ- -リノレイン酸の値は体重増加化に伴って高くなり、DHA は低くなる。しかし、ジホモ- -リノレイン酸の値は連鎖解析の結果、遺伝子は同定されないが、DHA はその合成酵素である遺伝子の変が発見された。これらの結論から、血清の脂肪酸組成は、遺伝的変異が原因である変化と、環境要因である変化が見られることがわかった。

### 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 1 件)

Yasutake Tanaka, Koji Nagao, Hideaki Nakagiri, Toshiro Nagaso, Yasue Iwasa, Haruhiko Mori, Makoto Asahina, katsumi imaizumi, MASAO SATO, Unavailability of liver triacylglycerol increases serum cholesterol concentration induced by dietary cholesterol in exogenously hypercholesterolemic (ExHC) rats, *Lipids in Health and Disease*, 13, 19-30, 2014.01.

[学会発表](計 13 件)

佐藤匡央, ヒト脂肪酸組成を測るということ、日本植物油協会 栄養研究会、2012.11.9、東京

田中愛健, 河野通生, 山口千仁, 朝比奈誠, 佐藤 匡央, 食事性高コレステロール血症モデルラットにおけるホモシステイン代謝, 第 52 回日本油化学会年, 2013.09.04、福岡

石塚友里絵, 大澤徳子, 佐藤 匡央, 酸化コレステロールの LXR に対する結合活性, 第 50 回化学関連支部合同九州大会, 2013.07.06、北九州

岩田夏記, 塩田将貴, 柳修平, 柳綾佳, 佐藤 匡央, 5 $\alpha$ -hydroxy-6 -keto-cholestanol が肝臓の脂質蓄積に及ぼす影響, 第 50 回化学関連支部合同九州大会, 2013.07.06. 北九州

田中愛健, 河野通生, 山口千仁, 朝比奈誠, 佐藤 匡央, 食事性高コレステロール血症モデルラットにおけるホモシステイン代謝, 第 52 回日本油化学会年, 2013.09.04. 仙台

Tanaka Y, Nagao K, Nakagiri H, Nagaso T, Iwasa Y, Mori H, Asahina M, katsumi imaizumi, MASAO SATO, Increase of Serum Cholesterol Level Induced by Dietary Cholesterol Involves Secretion of Triacylglycerol from Liver in EXHC Rats, IUNS 20th International Congress of Nutrition, 2013.09.18. Granada, Spain

佐 匡央, 酸化コレステロールと動脈硬化症, 第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2013.07.19, 東京

佐藤匡央, 食事酸化コレステロールの吸

収, 第 3 回食後サイエンス懇話会, 2013.07.13. 東京

佐藤匡央, 酸化コレステロールの臓器間の違いと疾病バイオマーカーとしての可能性, 第 43 回日本栄養・食糧学会北海道支部会, 2013.10.26. 札幌

鈴木隆久, 田中愛健, 石田尽, 佐藤匡央, 食事誘導性高コレステロール血症(ExHC)ラットにおける糖質代謝, 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2014.05.31 札幌

鈴木隆久, 田中愛健, 石田尽, 佐藤匡央, 食事誘導性高コレステロール血症(ExHC)ラットの肝臓における糖質代謝, 第 51 回化学関連支部合同九州大会, 2014.06.28. 北九州

佐藤匡央, 食事誘導性高コレステロール血症(ExHC)ラットにおける糖質代謝, 第 26 回夏期油脂・コレステロール研究会, 2014.07.19. 福岡

岩田夏記, 田中翔士, 河東華均, 林拓也, 城内文吾, 佐藤匡央, 糖尿病ラットの病態と酸化コレステロールの関係, 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 2014.09.19. 佐賀

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 匡央 (SATO, Maso)

九州大学大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 90294909

### (2) 研究分担者

城内 文吾 (SHIROUTI, Bungo)

九州大学大学院農学研究院・助教

研究者番号: 00548018