

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670285

研究課題名(和文) インスリン抵抗性及び炎症のバイオマーカーとしての非コレステロールステロールの検討

研究課題名(英文) Examination of non-cholesterol sterols as biomarkers for insulin resistance and inflammation

研究代表者

塚本 和久 (TSUKAMOTO, Kazuhisa)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：20251233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いた基礎研究では、ステロール代謝経路に同じ操作を加えても個体の状態によりインスリン抵抗性や炎症に対する効果は異なるものの、飽食状態である現在人を反映するモデルでは、内因性ステロール合成亢進はインスリン抵抗性を悪化させ、外因性ステロール吸収亢進は炎症性サイトカイン低下をもたらすことが判明した。臨床横断研究では、ラノステロールがインスリン抵抗性・炎症と正相関し、外因性/内因性ステロール比がインスリン感受性と正相関する可能性が示唆された。両研究結果を合わせると、肝臓でのステロール合成マーカーはインスリン抵抗性・炎症と正相関し、吸収/合成比はインスリン感受性と正相関する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Animal studies, in which pathways affecting sterol metabolism were modulated, revealed complicated associations of sterol metabolism with insulin resistance and with inflammation; however, in animals under high fat diet, which would reflect the current human health status under excessive eating, up-regulation of internal sterol production worsened insulin resistance, and increased external sterol absorption reduced the expression of inflammatory genes. From clinical studies, lanosterol levels were found to be positively correlated with the degrees of insulin resistance and inflammation, and the ratios of external/internal sterol were found to be positively associated with insulin sensitivity. Thus, we can propose that sterol production marker would positively correlate with insulin resistance and inflammation, and sterol absorption marker might positively correlate with insulin sensitivity; further precise analyses in basic and clinical studies would warrant these observations.

研究分野：代謝

キーワード：非コレステロールステロール インスリン抵抗性 炎症 バイオマーカー 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

LDL コレステロールは動脈硬化症の最大の危険因子であり、脂質異常症治療における管理対象の主要指標として用いられる。一方、脂質異常症治療薬の中で現在最も広く用いられている HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)を用いて LDL コレステロールを低下させても、動脈硬化イベント発症は 30~40%程度しか抑制できないことがわかっており、動脈硬化の残余リスクとしての危険因子とそのバイオマーカーの探索が大きな課題となっている。そして、このような残余リスクの一つの候補として、インスリン抵抗性が挙げられる。インスリン抵抗性は、単に糖尿病の発症の基盤となるのみならず、糖尿病と独立した動脈硬化の危険因子であり、また、急速に進んでいる高齢化社会において大きな問題となっている発癌、認知症との関連も指摘されており、全人的な治療という視点からも非常に重要なターゲットである。

一般的に臨床検査で測定されるステロールはコレステロールであるが、体内にはコレステロール以外のステロール(外因性のステロールとして、シトステロールやカンペステロール、内因性のステロールとしてラノステロールやデスモステロールなど)も微量ながら存在している。また、血中コレステロールレベルも、単一の代謝経路により規定されるのではなく、いくつかの代謝経路により規定されている。申請者らは、これまでの基礎研究より、このようなステロールの種類の違い(A)や、コレステロールの代謝経路の相違(B)は、異なる生理的作用を持つ可能性を解明してきていた。例えば、(A)シトステロールやカンペステロールといった植物ステロールは、コレステロールと比較して、マクロファージに対する炎症性サイトカイン誘導作用が弱く、また、植物ステロールは肝細胞や脂肪細胞に対して炎症に対して保護的な作用を有する可能性があること、(B)脂質異常症治療薬エゼチミブの標的タンパク NPC1L1 は、血糖低下作用を有する可能性があること、一方、肝臓におけるラノステロール合成酵素の過剰発現や LDL 受容体の過剰発現が、インスリン抵抗性を改善する作用を有する可能性があること、を見出してきていた。

2. 研究の目的

本研究では、(A)基礎研究にて、コレステロールおよび非コレステロールステロールの代謝に影響を有する代謝経路を、異なる環境下(食事の変化)で人為的に変動させることが、インスリン抵抗性および炎症にどのような効果を有するのかを検討し、(B)臨床研究として、患者サンプルの炎症性マーカーおよびステロールを一斉定量して、インスリン抵抗性および炎症と関連が深いステロールを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(A) 動物実験を用いた基礎研究アプローチ: 植物ステロール代謝経路や肝臓でのコレステロール代謝経路(内因性ステロール変動経路を含む)を通常食マウスおよび高脂肪食負荷マウスで変動させることにより、これらの経路とインスリン抵抗性や炎症との関連性を検討した。

(B) ヒトサンプルを用いた臨床研究アプローチ: ヒトにおけるコレステロール以外のステロールとインスリン抵抗性、肥満、炎症との関連についての観察研究により、各ステロールのインスリン抵抗性や炎症との関連を探索した。

4. 研究成果

(A) 植物ステロールや肝臓でのコレステロール代謝経路と、インスリン抵抗性および炎症との関連

植物ステロールによるインスリン抵抗性・炎症との関連

血中植物ステロール濃度が上昇する ABCG5/8 欠損マウスを用い、通常食または高脂肪食で飼育することにより、その脂肪肝・脂肪組織の炎症、体重増加やインスリン抵抗性に対する効果について検討した。通常食飼育下では、ABCG5/8 欠損ホモ型ではヘテロ型と比較して体重増加・臓器重量に変化を認めなかったが、ホモ型の方が肝臓および脂肪組織における炎症性メディエータの発現が増加していた(図1)。一方、高脂肪食飼育下では、ホモ型の方が体重増加が緩やかであり、精巣周囲脂肪組織が小さく、肝臓重量も少なかったが、空腹時血糖、インスリン値には両

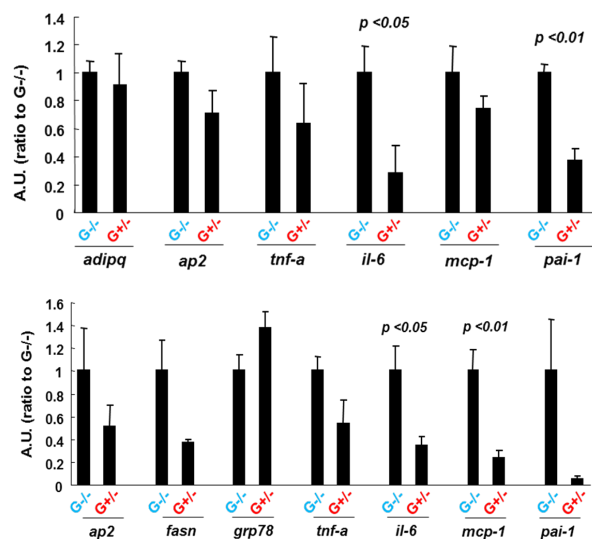


図1. 通常食投与時の ABCG5/8 欠損マウスの肝臓(上)脂肪組織(下)での炎症性メディエータの変化

群間で有意差は認められなかった。炎症性メ
 ディエータの発現に関しては、ホモ型におい
 て、低下を認めた(図2)。

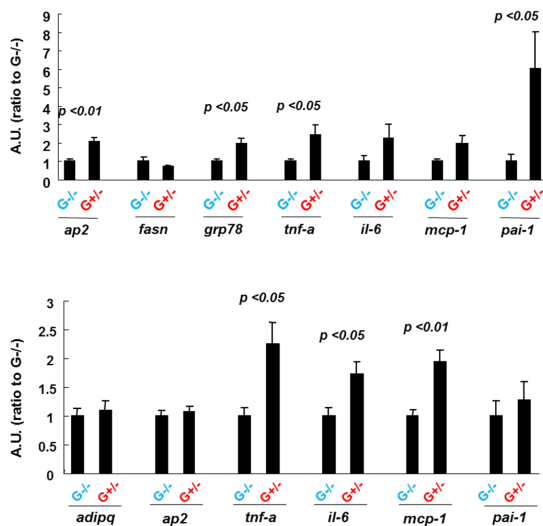


図2 . 高脂肪食投与時の ABCG5/8 欠損マウスの肝臓(上) 脂肪組織(下)での炎症性メ
 ディエータの変化

以上の結果より、植物ステロールは、肥満時
 には抗炎症作用、非肥満時には催炎症作用を
 持つことが示唆された。

肝臓のコレステロール代謝経路とインス リン抵抗性

1 . 肝臓において胆汁からのコレステロール
 再吸収を担う NPC1L1 を、食餌誘導肥満マウ
 ス肝臓にアデノウイルス(ADV)を用いて過剰
 発現させると、空腹時血糖値、自由摂食下血
 糖値が低下した(図3)。これは、核内蛋白
 Fox01 の発現量が低下する(図4)ことによ
 る糖新生低下機序によるものであり、インス
 リン抵抗性の指標である Akt のリン酸化やイン
 スリン負荷試験でのインスリン感受性には
 変化は認めなかった。

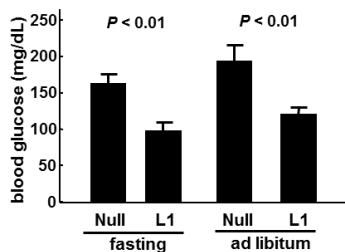


図3 . NPC1L1 過剰発現は食事誘導肥満マウスの血糖を低下させる

2 . 肝臓における循環血液中からのリポ蛋白
 の取り込みに重要な役割を果たしている LDL
 受容体(LDL-R)を食事誘導肥満マウス肝臓に
 ADV を用いて過剰発現させると、自由摂食下
 での血糖値が低下した(図5)。また、イン

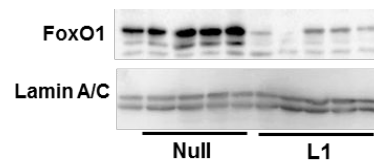


図4 . NPC1L1 過剰発現は Fox01 の発現を低下
 させる

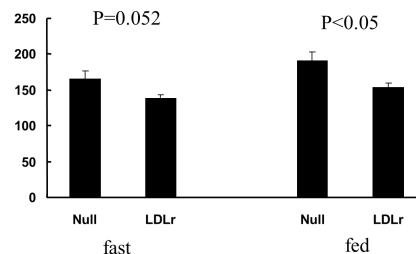


図5 . LDL-R 過剰発現は食餌誘導肥満マウスの血糖を低下させる

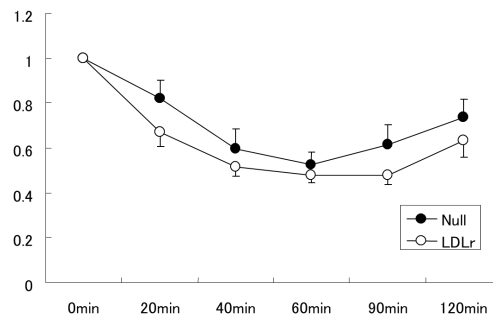


図6 . LDL-R 過剰発現は食餌誘導肥満マウスのインスリン抵抗性を改善させる

スリン負荷試験での血糖の低下が大きく、イン
 スリン感受性の増強を認めた(図6)。

3 . 肝臓におけるコレステロール合成を担い、
 デスモステロールおよびラノステロールの
 血中増加をもたらす可能性のある HMG-CoA 還
 元酵素(HMGCR)およびラノステロール合成酵
 素(LSS)を通常食マウスおよび食餌誘導肥満
 マウスの肝臓に ADV を用いて過剰発現させた。
 食餌誘導肥満マウスにおいては HMGCR 過剰
 発現により、インスリン負荷試験におけるイン
 スリン感受性の低下(図7)を認めたのに対
 し、LSS では、空腹時血糖、自由摂食下血糖
 が低下し、インスリン負荷試験ではインスリン
 感受性亢進を認め(図8) HMGCR と相反す
 る結果が観察された。また、興味深いことに、
 通常食マウスでの検討では、HMGCR 過剰発
 現ではインスリン感受性亢進、LSS 過剰発現
 では血糖値の上昇、を認めた。すなわち、HMGCR
 と LSS はいずれもコレステロール合成を担う
 酵素であるにも関わらず、糖代謝に対する影
 響が異なり、さらに食事という環境の違いで
 その効果も異なることが判明した。

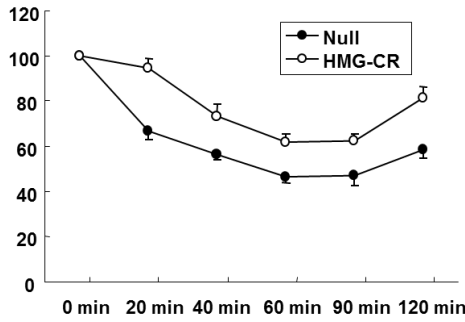


図7. HMGCR の過剰発現は食餌誘導肥満マウスのインスリン抵抗性を悪化させる

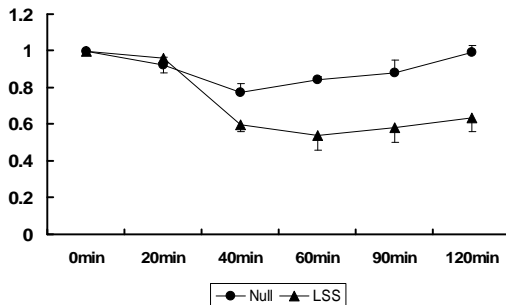


図8. LSS の過剰発現は食餌誘導肥満マウスのインスリン抵抗性を改善させる

(B) ヒトにおけるコレステロール以外のステロールとインスリン抵抗性、肥満、炎症との関連についての観察研究

40歳以上65歳未満の、インスリンによる治療を行っておらず、かつ脂質異常症治療薬を内服していない、重篤な疾患を合併していない者をリクルートした。最終的に、健康診断受診者185名(糖尿病11名、非糖尿病174名)、外来受診中の大血管合併症のない、腎症2期以下の比較的軽症の糖尿病患者35名および非糖尿病5名より同意を取得し、身体所見および空腹時採血血清検体での一般臨床検査、ELISAにてのアディポネクチン、TNF、IL-6、PAI-1の測定、HPLCを用いたのステロール分画の一斉定量(図9)を行った。非糖尿病患者のうち、BMIが24未満のものは68名(48.7±5.7歳)、24以上の者111名(48.5±5.4歳)、糖尿病患者のうちBMIが24未満の者15名(54.5±7.3歳)、24以上の者31名(52.9±7.0歳)であった。

糖尿病の有無別のインスリン抵抗性・炎症・非コレステロールステロールの相違
 糖尿病患者と非糖尿病患者の比較では、糖尿病患者群では、HOMA-IRが有意に高くHOMA-1は低かったが、IL-6およびTNFの炎症性マーカーは糖尿病群で有意に低値であった。アディポネクチン(adipo)値およびPAI-1値は、両群で有意差はなかった。肝臓でのステロール合成を示すデモステロール(desmo)・ラノステロール(lano)、および5コレスタノ

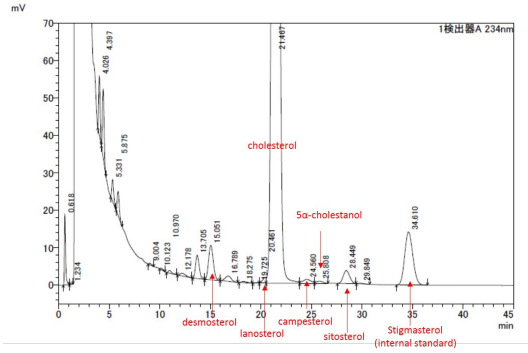


図9. ヒト血清を用いたステロール一斉定量の例

ール(5 chol)は糖尿病患者で低値(図10)であり、吸収/合成比のマーカーであるシトステロール(sito)やカンペステロール(camp)と、desmo・lanoとの比は、糖尿病群で高値であった(図10)。コレステロールとの比で検討すると、desmo・lanoの低下に加えてsitoの上昇を糖尿病群で認めた(図11)。全症例での炎症性サイトカインと非コレステロールステロールの相関解析では、IL-6とTNFはdesmoおよびlanoと正の相関、吸収/合成マーカー比と負の相関を示した。IL-6、TNF値で4分画しての検討では、IL-6の高い群ではdesmoが増加し、sitoの割合が低下していた。TNFの高い群では、desmo、lanoが増加していた。PAI-1はlanoと正の相関、sito/lano比と負の相関を示したのに対し、adipo値はlanoと負の相関、camp・5 cholと正の相関を示し、

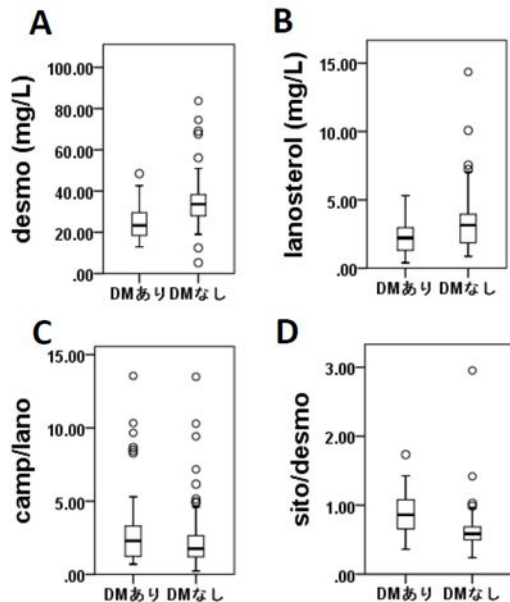


図10. 糖尿病有無別の非コレステロールステロールの相違 (A)desmo値、(B)lano値、(C)camp/lano比、(D)sito/desmo比

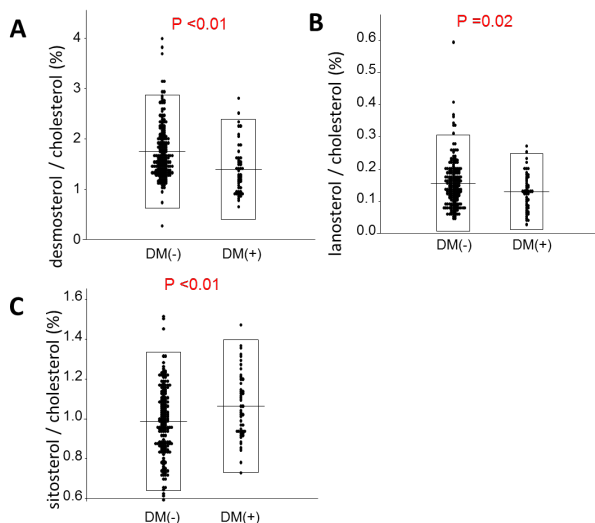


図 11. 糖尿病有無別の非コレステロールステロールとコレステロール (chol) 比 (A)desmo/chol 比、(B)lano/chol 比、(C)sito/chol 比

また吸収/合成マーカー比 (sito/desmo 比など) と正の相関を示した。

前述の通り、糖尿病患者では非糖尿病患者に比して、1)HOMA-IR 高値、2)IL-6, TNF 低値、3)Adipo, PAI-1 有意差なし、であったが、全例で HOMA 指数とサイトカインの相関を検討したところ、HOMA-IR は PAI-1 と正相関、Adipo と負相関するものの、IL-6 や TNF との相関は認めなかった。HOMA-IR は PAI-1・TNF と正相関、Adipo と負相関、を示した。また、HOMA-IR は lano と正相関、5 chol と負の相関を示したが、それ以外の非コレステロールステロールや、吸収/合成比とは相関を認めなかった。

糖尿病有無別のインスリン抵抗性 (HOMA-IR 値)・サイトカイン・非コレステロールステロールの関連

糖尿病患者と非糖尿病患者では、バックグラウンドが異なる可能性を考え、糖尿病有無別に同様の相関関係を検討した。全例での解析、糖尿病患者での解析、非糖尿病患者での解析で、すべての解析において正相関を認めたものは、HOMA-IR vs. lano、IL-6 vs. lano、IL-6 vs. chol、adipo vs. camp/desmo 比、adipo vs. sito/lano 比、であり、逆相関を示したのは HOMA-IR vs. adipo であった。

(C)まとめ・考察

基礎研究からは、植物ステロールはインスリン抵抗性には大きく影響はしないものの、高脂肪食負荷では抗炎症作用、通常食状態では催炎症作用を認め、生体の状態により影響が異なることが示唆された。また、当初ある一定の方向性の結果が得られるものと考え

て行った肝臓内のコレステロール量・血中合成ステロールマーカーを変動させる様々な実験から、肝臓でのステロール代謝と糖代謝の関連は非常に複雑であり、コレステロール量変動をもたらす経路や作用ポイント、あるいは生体の状態 (高脂肪食負荷 or 通常食) により、インスリン抵抗性や血糖値の動きに対して異なった結果をもたらされることが判明した。このように、本研究で得られた結果は複雑ではあるが、コレステロール合成の律速段階が LSS ではなく HMGCR であること LDL-R 発現は HMGCR の発現を低下させること、現在のヒトにより近いモデルは通常食マウスではなく高脂肪食負荷マウスであること、を考慮して考察すると、肝臓でのコレステロール合成亢進系はインスリン抵抗性を悪化し、植物ステロール吸収亢進は炎症性サイトカイン低下に結びついている可能性が示唆された。

臨床研究からは、HOMA-IR が非糖尿病患者よりも高値である糖尿病患者群では IL-6・TNF・lano・desmo が低値、吸収/合成比高値であった。全体解析で IL-6 と TNF が lano・desmo と正相関、吸収/合成比と逆相関していた。全体での解析、糖尿病患者での解析、非糖尿病患者での解析で、共通して認められたのは lano と HOMA-IR および IL-6 の正相関、善玉サイトカインと考えられている adipo と吸収/合成比の正相関であった。以上の結果は、ステロール合成亢進はインスリン抵抗性・炎症と相関し、吸収/合成比の上昇は良好なインスリン感受性と相関する可能性を示唆するものと考えられる。今回の臨床研究は横断研究であるため、その因果関係は不明であるが、前述の基礎研究での結果と合わせると、肝臓でのコレステロール合成亢進はインスリン抵抗性・炎症悪化と関連し、吸収/合成比の上昇はインスリン抵抗性改善と関連がある可能性があると考えられる。

本検討で判明した通り、ステロール代謝と糖代謝は密接に関連があるが、その関連は非常に複雑である。今後、基礎研究ではコレステロール合成経路の産物 (ファルネソールやゲラニルゲラニオールなど) を検討すること、また臨床検討ではクラスター解析などを行うこと等により、ヒトにおける非コレステロールステロールの糖代謝・慢性炎症に対するバイオマーカーとしての有用性をさらに詳細に検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Kurano M, Hara M, Satoh H, Tsukamoto K. Hepatic NPC1L1 overexpression ameliorates glucose metabolism in diabetic mice via suppression of gluconeogenesis. *Metab-Clin Exp* 査読有、64(5):588-96, 2015. doi:10.1016/j.metabol.2015.01.011

〔学会発表〕(計 4 件)

Makoto Kurano, Masumi Hara, Yutaka Yatomi, Kazuhisa Tsukamoto: Plant sterol protects diet induced obese mice against inflammation in liver and adipose tissue. 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2014年7月10-11日 於：東京

蔵野 信, 矢富 裕, 塚本 和久: 植物ステロールとコレステロールの炎症における生物学的作用の相違 第54回 日本臨床化学会年次学術集会 . 2014年9月7日 於：東京 .

蔵野 信, 原 眞純, 常山 幸一, 矢富 裕, 塚本 和久: 肝臓胆汁間のコレステロールハンドリングの糖代謝への影響(YIA 候補演題) 第52回日本臨床分子医学会学術総会 2015年4月10-11日 於：京都
Makoto Kurano, Koichi Tsuneyama, Masumi Hara, Yutaka Yatomi, Kazuhisa Tsukamoto: Human hepatic ABCG5 lacks the potency for sterol excretion. 第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2015年7月9-10日 於：仙台

〔図書〕(計 5 件)

塚本 和久. コレステロール代謝異常の病態生理 6 . 植物ステロール・酸化コレステロール 新ABC 高LDL-C血症・低HDL-C血症 (倉林正彦 編) 最新医学社 pp 87-95, 2015

蔵野 信, 塚本 和久. NPC1, NPC1L1モデル動物利用マニュアル 脂質代謝異常と関連疾患<上巻> (尾池雄一、佐々木雄彦、村上誠、矢作直也 編) LIFE-SCIENCE INFIRMATION CENTER pp 221-228, 2015

蔵野 信, 木下 誠. ABCG5/8 . 脂質代謝異常と関連疾患<上巻> (尾池 雄一, 佐々木 雄彦, 村上 誠, 矢作 直也 編) pp. 327-332 .エル・アイ・シー, 東京 .2015 .

蔵野 信. 炎症性サイトカイン . 動脈硬化予防 (寺本 民生 編) pp. 52-57 . メジカルビュー社, 東京 . 2015

塚本 和久, 蔵野 信, 東郷 眞子 シトステロール血症の現状とその対応 新薬と臨床 65 (1), 111-115, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

(特になし)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

塚本 和久 (TSUKAMOTO, Kazuhisa)

福島県立医科大学・公私立の部局等・教授

研究者番号： 20251233

(2)研究分担者

蔵野 信 (KURANO, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 60621745

原 眞純 (HARA, Masumi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号： 70420213

(3)連携研究者

(なし)