

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：84305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750330

研究課題名(和文) 心血管病予防に向けた摂取栄養素とアディポサイトカインに基づく効果的栄養指導の確立

研究課題名(英文) Establishment of Effective Nutrition Guidance Based on the Nutrients and Adipocytokines to Prevent Cardiovascular Diseases

研究代表者

佐々木 洋介 (SASAKI, YOUSUKE)

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：00533837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥満症と糖尿病の多施設前向きコホートを構築し、糖尿病による単球・プラークの炎症増悪化、脂肪組織由来生理活性物質TSP-1の内臓肥満性疾患との関連、大豆製品摂取率とアディポネクチンとの正相関、血中エイコサペンタエン酸(EPA)/アラキドン酸比とアディポネクチンとの正相関とともに、EPAは脳内Mに抗炎症的に作用することを見出した。大豆の腸内細菌代謝産物投与によりLDL-Cと動脈硬化指標CAVIが低下し、そのLDL-CとCAVIの低下は正相関することも見出した。本研究結果は脂質の質や腸内細菌叢を標的とした心血管病リスク低減のための効果的な栄養指導指針確立に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We constructed a multicenter prospective cohort of patients with obesity and diabetes and found (1) exacerbation of inflammatory properties of monocytes/carotid plaque by diabetes, (2) relationship of the adipose tissue-derived product, TSP-1, with the visceral fat obesity-related diseases, (3) positive association of the intake rate of soy products with the adiponectin level, (4) positive association of the serum ratio of eicosapentaenoic acid (EPA) to arachidonic acid with the adiponectin level, and (5) anti-inflammatory effects of EPA on cerebral macrophages. We also showed the reduction of LDL-C and CAVI, an indicator of atherosclerosis, by administration of soy bean-metabolites of enterobacteria, and the LDL-C reduction was positively correlated with the CAVI reduction. Our findings should contribute to the establishment of effective nutrition guidance to reduce risk for cardiovascular diseases by focusing on the lipid quality and intestinal flora.

研究分野：肥満症

キーワード：栄養指導 肥満症 糖尿病 代謝症候群 アディポサイトカイン 動脈硬化症 心血管病 腸内細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

近年、肥満・糖尿病に伴う動脈硬化症・心血管病 (CVD) が増加しており、効果的な CVD 予防・治療のためには、進展機序の解明と包括的治療法及び積極的な栄養指導の確立が急務である。

肥満・糖尿病の基盤病態は慢性炎症であり、炎症担当細胞として単球・マクロファージ (M) が重要な役割を果たしている。肥満の脂肪組織では、脂肪細胞が様々な生理活性物質 (アディポサイトカイン) を産生するのみならず、M の浸潤増加と質的变化 (抗炎症性・M2 M から炎症性・M1 M への転換) が認められ、インスリン抵抗性や炎症亢進に関与することが報告された (J Clin Invest 2007)。申請者らも、ヒト末梢血単球において、肥満や糖尿病による M1 マーカー (炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ , IL-6) 発現上昇及び M2 マーカー (抗炎症性サイトカイン IL-10) 発現低下という M1/M2 バランス悪化を認め、動脈硬化進展との関連を明らかにしてきた (Diabetes Care 2010)。また、生活習慣病薬やインクレチン関連薬による単球の M1/M2 バランス改善効果も認めている (Diabetes Care 2007; Metabolism 2013)。よって、肥満・糖尿病に伴う動脈硬化症・CVD の病態改善には単球や M の質的改善が重要と考えられるが、質的改善の機序の詳細は明らかでなく、肥満・糖尿病における M1/M2 バランス悪化の機序についてもほとんど解析されていない。

脂肪酸には飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸があり、飽和脂肪酸やトランス型脂肪酸の摂取過多による CVD リスク上昇が報告されている (NEJM 1997)。一方、疫学研究から、魚油や n3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の CVD 予防効果が示されてきており、大規模研究 JELIS にて n3 PUFA・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 2007)。また、n6 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が、EPA/AA 比上昇により、心臓突然死や心筋梗塞の発症リスクが低下することも報告されている (Circ J 2009)。申請者らも、肥満において、EPA による動脈硬化惹起性リポ蛋白 small dense LDL、酸化 LDL、動脈硬化指標・CAVI の改善やアディポネクチン上昇を報告するとともに、肥満者の EPA/AA 比が動脈硬化指標・CAVI と逆相関することも見出している (ATVB 2008, Diabetes Care 2012)。以上、CVD 予防には脂肪総摂取量のみならず、脂質の質・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。しかしながら、これまでに十分な EBM や摂取脂質に応じた栄養指導・指針は確立されておらず、脂質による単球・M の質的改善作用についても詳細な機序は明らかでない。

さらに、近年、肥満・糖尿病と腸内細菌叢との機能的連関が注目されている。大豆イソ

フラボンやエストロゲン様作用を有し、糖脂質代謝・動脈硬化の改善効果 (NEJM 1995, Diabetes Care 2002) や脳梗塞発症リスク軽減効果が報告されているが (Circulation 2007)、腸内細菌叢によりイソフラボン成分ダイゼインから変換されるエクオール (EQ) が特に強いエストロゲン様作用を有すること、及び、EQ 産生菌を持つヒト (EP) と持たないヒト (ENP) が存在することが分かってきた。よって、大豆摂取による CVD リスク軽減効果は、EQ 産生能に影響される可能性がある。申請者らも、肥満者では EP の割合が低率 (約 40%) であることを認めており、大豆の作用に対する感受性の違いに腸内細菌叢の違い (EQ 産生能) が関与する可能性を見出している。

以上の知見に立脚し、本研究では、申請者らによる国内初の肥満症・糖尿病の多施設コホートを基盤に、肥満症・糖尿病における単球・M 機能や脂肪組織に由来する栄養環境に反応する生理活性物質の病態意義を検討する。また、特に脂質の質・脂肪酸 4 分画 (EPA/AA 比) に焦点を当て、摂取栄養素と CVD 指標との関連を検討するとともに、EQ 産生能や EQ による CVD 予防効果を検討し、腸内細菌叢に着目した大豆製品の栄養指導を考案する。以上、CVD 予防に向けた各栄養素の摂取率別の至適栄養指導プログラム確立を目指す。

## 2. 研究の目的

肥満症・糖尿病コホートと簡易式自記式食事歴法質問表:BDHQ 成績を基盤に、下記項目より、摂取栄養素とアディポサイトカイン値に基づいたオーダーメイド栄養指導を確立する。

1) 栄養調査による各栄養摂取量・率 (炭水化物、肉・魚・大豆等の蛋白質、脂質の分類・カロリー) と CVD リスク指標 (アディポサイトカインや動脈硬化指標等) との関連

2) 各脂肪酸摂取量・各脂肪酸分画・飽和/不飽和比・EPA/AA 比とメタボリック症候群 (MetS)・CVD リスク指標との関連

3) エクオール産生の有無と MetS・CVD リスクとの関連、エクオールによる CVD リスク改善効果

4) 各栄養素の摂取量・率の減量・薬物治療効果に与える影響の検討

5) 減量や EPA など薬物治療による各脂肪酸分画・EPA/AA 比の変化と CVD リスク改善効果

さらに、肥満・糖尿病における単球・M プラークの M1/M2 バランスや脂肪組織に由来する生理活性物質 (アディポネクチン、TSP-1 等) の病態意義を明らかにし、摂取栄養素 - 腸内細菌叢 - CVD リスクの関連を検討することにより、摂取栄養素の量・質とホルモン値を包括的に捉えた CVD 発症予防の為に効果的なオーダーメイド栄養指導プログラムの確立を目指す。

### 3. 研究の方法

肥満症・糖尿病における単球・M<sub>1</sub>機能やアディポサイトカインの病態意義を検討するとともに、各栄養素の摂取量(率)とMetS/CVDリスクとの関連解析により各栄養素に関するEBMを蓄積し、さらに、腸内細菌叢の影響も検討する。

#### A. 臨床研究

I. 肥満症・MetSの多施設共同コホート集団の構築と各栄養素摂取率のCVDリスクとの関連解析:

連携研究者(佐藤)と連携して肥満症・糖尿病の前向き多施設コホート集団を対象に下記評価項目に関するデータベースを構築し、食事・運動療法による減量治療を施行し、下記の定期的測定を柱とし各摂取栄養素とCVDリスクとの関連を解析する。

1)登録対象:肥満症(BMI $\geq$ 25),または糖尿病症例

2)治療指針:食事・運動療法による減量治療、各学会の診療ガイドラインに準拠して薬物療法を併用。

3)観察ポイント:減量前、減量治療3, 6, 12, 24ヶ月後。

4)臨床評価項目:肥満歴(生下時体重、20歳時体重、最高体重、20歳からの体重変化)

家族歴:肥満・糖尿病・高血圧・高脂血症・心血管病等

生活歴:飲酒/喫煙歴、喫煙本数・年

栄養調査:簡易式自記式食事歴法質問表:

BDHQ(摂取食品を各栄養素別に分類・カロリー換算できる質問表)を用い、総カロリー・食事内容・各栄養素摂取量から、炭水化物・蛋白質・脂質の摂取量(率)、脂肪酸バランス(SMP比)算出。大豆・肉類・魚類・果物・食物繊維など各栄養素摂取率を算出。

身体組成:体重、BMI、腹囲、皮下・内臓脂肪量(臍部CT) 血圧、脈拍 MetSの有無・MetS危険因子の重症度

血中・尿中評価項目 a)糖脂質代謝,リポ蛋白, IRI, HOMA-R、 b)腎機能: Alb, e-GFR, Cys-C、 c)炎症性サイトカイン(hsCRP, IL-6) d)アディポサイトカイン(TNF $\alpha$ , レプチン, アディポネクチン)、 e)炎症指標(hsCRP) 酸化ストレス(尿8-OhDG等)

血中脂肪酸 24分画、飽和/不飽和脂肪酸比、血中EPA/AA比 動脈硬化指標:PWV, CAVI, IMT, FMD

心血管機能検査:心エコーによる左室拡張能評価、頭部MRI

エネルギー代謝関連因子:a)基礎代謝測定:呼吸ガス分析装置(FIT-2200:日本光電)の測定。b)同意取得手術症例の頸動脈硬化症プラーク、皮下・内臓脂肪組織を得て、M1/M2関連マーカー・アディポサイトカイン等遺伝子発現を検討。

予後:総死亡、CVD合併症(心疾患・脳卒中発症)を追跡し、摂取栄養素との関連を解析。

#### 5)データ解析:

横断研究:摂取栄養素と上記MetS・CVDリスクとの関連を解析する。

縦断研究:観察研究+減量・薬物併用療法によるCVDリスク改善効果への各栄養素の影響を解明する。

II. エクオールの臨床研究:肥満・糖尿病において、

大豆摂取とCVDリスクとの関連解析。

エクオール産生の有無とCVDリスクや減量効果との関連解析:尿中エクオール測定(ELISA)。

エクオール(大塚)10mg/日投与の無作為割付によるCVDリスクへの長期的効果の検討。

以上、大豆摂取やエクオールの有効性とその機序を解明し、「EPと大豆摂取に着目したCVD予防オーダーメイド栄養指導プログラム」を確立する。

#### B. 基礎研究

脳内炎症担当細胞である脳内M<sub>1</sub>・ミクログリアを対象に、EPA等のn3 PUFAによる炎症性・抗炎症性への影響を、M1/M2関連マーカー発現やシグナル伝達解析により明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究では、肥満症と糖尿病の多施設前向きコホート1334例登録による大規模データベース構築に成功し、肥満症・糖尿病における単球・マクロファージ(M<sub>1</sub>)機能や脂肪組織に由来する生理活性物質(TSP-1等)の病態意義を検討するとともに、摂取栄養素と心血管病(CVD)指標との関連を検討した。その結果、頸動脈硬化症において糖尿病を合併すると単球・プラークのM1上昇/M2低下(M1/M2バランスの増悪化)を認め、そのことが動脈硬化症進展に寄与する可能性を見出した(J Atheroscler Thromb 2016 in press)。また、TSP-1は皮下脂肪組織よりも内臓脂肪組織で発現が高く、血清TSP-1値は肥満度と正相関を示し、減量治療による血清TSP-1変化量は糖脂質代謝指標(HbA1c等)の変化量と逆相関を示すことを見出した。よってTSP-1は内臓肥満起因性疾患に関与することが示唆された(Metabolism 2015)。さらに、簡易栄養調査及び簡易型自記式食事歴法質問票を用いた栄養調査において、大豆製品の摂取率と抗動脈硬化ホルモン・アディポネクチンに正相関を認め、血中エイコサペンタエン酸(EPA, n3 PUFA)/アラキドン酸(AA, n6 PUFA)比とアディポネクチンについても正相関があることを見出した。基礎的検討から、脳内炎症担当細胞である脳内M<sub>1</sub>・ミクログリアにおいて、n3 PUFAにより炎症性サイトカインTNF $\alpha$ ・IL-6産生が抑制されることも認めている。

また、大豆イソフラボンはエストロゲン様作用や抗酸化作用を有し、メタボリック症候群(MetS)や脳梗塞の予防効果が期待され

ている。イソフラボンの中のダイゼインは腸内細菌の代謝によりエクオール (EQ) に変換されるが、EQ 産生菌を持つヒト (EP) と持たないヒト (ENP) が存在し、大豆摂取の感受性に影響する可能性がある。本研究にて、肥満症・MetS における EQ 産生能及び EQ 産生能と心血管病リスクとの関連を介入研究 (EQ 10 mg/日またはプラセボ内服、各 3 ヶ月間) により検討した。その結果、肥満症 54 例中、EP は 17 例 (32%) であり、一般人の報告 50% より低率であることを見出した。また、ENP に比し EP においては単球中の TNF $\alpha$  発現量が低値となる傾向を見出した。さらに、EQ 投与により LDL-C と動脈硬化指標 CAVI の有意な低下を認め、特に女性の ENP で効果が顕著であった。また、EQ 投与による LDL-C 低下と CAVI 低下に有意な正相関を認めた。

以上、本研究成果は脂質の質 (EPA/AA 比等) や腸内細菌叢改善 (EQ 産生向上等) が CVD リスク低減に寄与する可能性を示す成果であり、EPA/AA 比や EQ 産生能の活用を介した、より効果的な栄養指導指針確立に貢献できると考えられる。

#### 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 2 件)

Tanaka M, Masuda S, Matsuo Y, Sasaki Y, Yamakage H, Muranaka K, Wada H, Hasegawa K, Tsukahara T, Shimatsu A, Satoh-Asahara N. Hyperglycemia and Inflammatory Property of Circulating Monocytes are Associated with Inflammatory Property of Carotid Plaques in Patients Undergoing Carotid Endarterectomy. *J Atheroscler Thromb in press*, 2016. 査読有. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27001002>

Matsuo Y, Tanaka M, Yamakage H, Sasaki Y, Muranaka K, Hata H, Ikai I, Shimatsu A, Inoue M, Chun T-H, Satoh-Asahara N. Thrombospondin 1 as a novel biological marker of obesity and metabolic syndrome. *Metabolism* 64:1490-1499, 2015. 査読有. doi: 10.1016/j.metabol.2015.07.016.

##### [学会発表] (計 16 件)

浅原哲子、松尾禎之、田中将志、増田慎也、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、猪飼伊和夫、畑啓昭、井上真由美、全泰和、島津章：内臓・皮下脂肪蓄積における線維化関連因子 TSP-1 の病態生理学的意義の検討 第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー (2015 年 7 月 9-11 日、福岡)  
松尾禎之、田中将志、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、猪飼伊和夫、畑啓昭、島

津章、井上真由美、全泰和、浅原哲子：肥満における内臓・皮下脂肪蓄積と線維化関連因子 TSP-1 との関連解析 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2015 年 5 月 21-24 日、山口)

松尾禎之、田中将志、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、猪飼伊和夫、畑啓昭、島津章、井上真由美、全泰和、浅原哲子：肥満における内臓・皮下脂肪蓄積と線維化関連因子 TSP-1 との関連解析 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (2015 年 4 月 23-25 日、東京)

田中将志、松尾禎之、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、塚原徹也、島津章、浅原哲子：糖尿病・肥満における頸動脈プラーク浸潤マクロファージと末梢血単球の M1/M2 形質の連関 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (2015 年 4 月 23-25 日、東京)

Satoh-Asahara N, Matsuo Y, Tanaka M, Sasaki Y, Yamakage H, Muranaka K, Ikai I, Hata H, Shimatsu A, Inoue M, Tae-Hwa Chun. Sexually dimorphic, fat depot-dependent expression of a fibrogenic adipokine, thrombospondin 1 (THBS1) in human obesity. 2015 Keystone Symposia Conference, (March 22-27, 2015, Canada, British Columbia, Wistler Poster Number:3004)

Tanaka M, Matsuo Y, Muranaka K, Yamakage H, Sasaki Y, Shimatsu A, Satoh-Asahara N. GLP-1 receptor agonist attenuates the oxidized-LDL-induced foam cell formation through autophagy in macrophages and monocytes. 2015 Keystone Symposia Conference, (March 22-27, 2015, Canada, British Columbia, Wistler Poster Number:3014)

伊藤遼、山陰一、佐々木洋介、村中和哉、小島真司、河野茂夫、島津章、浅原哲子：糖尿病における心腎連関進展予測指標としての non HDL-C・参加 LDL の有用性 第 50 回日本糖尿病協会近畿地方会 (2014 年 11 月 23 日、京都)

浅原哲子、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、伊藤遼、小島真司、河野茂夫、島津章：DPP-4 阻害薬による末梢血単球 M1/M2 タイプへの影響と抗動脈硬化作用 第 50 回日本糖尿病協会近畿地方会 (2014 年 11 月 23 日、京都)

浅原哲子、村中和哉、佐々木洋介、山陰一、小谷和彦、山田努、荒木里香、岡嶋泰一郎、田邊真紀人、大石まり子、島津章：多施設肥満症コホートにおける脳心血管イベント発症予測指標の探索 -CAVI・新規酸化 LDL- 第 35 回日本肥満学会 (2014 年 10 月 24-25 日、宮崎)  
松尾禎之、田中将志、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、猪飼伊和夫、畑啓昭、島津章、井上真由美、Chun Tae-Hwa、浅原

哲子：肥満における内臓・皮下脂肪蓄積と線維化関連因子TSP-1との関連性 第35回日本肥満学会（2014年10月24-25日、宮崎）

田中将志、松尾禎之、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、塚原徹也、島津章、浅原哲子：頸動脈プラーク浸潤マクロファージ及び末梢血単球のM1/M2様形質に及ぼす肥満・糖尿病の影響 第35回日本肥満学会（2014年10月24-25日、宮崎）  
Satoh-Asahara N, Tanaka M, Matsuo Y, Yamakage H, Muranaka K, Sasaki Y, Odori S, Kono S, Shimatsu A: Effect of Sitagliptin and Vildagliptin, Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors, on M1/M2-like Phenotypes of Peripheral Blood Monocytes and Arterial Stiffness in Type 2 Diabetic Patients. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (September 12-14, 2014, Kyoto P-57)

Tanaka M, Matsuo Y, Sasaki Y, Yamakage H, Muranaka K, Tsukahara T, Shimatsu A, Satoh-Asahara N: Unbalanced M1/M2 phenotypes of monocytes and hyperglycemia associate with M1/M2 macrophages in the carotid atherosclerotic plaque in the patients with obesity and diabetes undergoing carotid endarterectomy. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (September 12-14, 2014, Kyoto P-16)

Matsuo Y, Tanaka M, Sasaki Y, Yamakage H, Muranaka K, Ikai I, Hata H, Shimatsu A, Inoue M, Chun T-H, Satoh-Asahara N: Sexually dimorphic, fat depot-dependent expression of a fibrogenic adipokine, thrombospondin 1 (THBS1) in human obesity. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (September 12-14, 2014, Kyoto P-101)

田中将志、松尾禎之、佐々木洋介、山陰一、村中和哉、塚原徹也、島津章、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産生に対する肥満・糖尿病の影響 日本内分泌学会第32回内分泌代謝学サマーセミナー（2014年7月10-12日、山梨）

浅原哲子、村中和哉、佐々木洋介、山陰一、小谷和彦、山田努、荒木里香、岡嶋泰一郎、田邊真紀人、大石まり子、島津章：多施設共同前向きコホート研究における肥満症の脳心血管イベント発症予測指標の探索-CAVI測定の臨床的意義- 第87回日本内分泌学会学術総会（2014年4月24-26日、福岡）

〔その他〕

ホームページ

京都医療センター臨床研究センター内分泌代謝高血圧研究部

URL:

<http://www.hosp.go.jp/~kyotolan/html/guide/medicalinfo/clinicalresearch/endocrinology/endocrinology.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 洋介 (SASAKI, Yousuke)  
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：00533837

### (2) 連携研究者

浅原 (佐藤) 哲子 (SATO-ASA-HARA, Noriko)  
京都医療センター・臨床研究センター・糖尿病研究部・研究室長  
研究者番号：80373512