

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15192

研究課題名(和文)末梢血単核球を標的とした生活習慣病リスク診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method for lifestyle-related disease risk targeting peripheral blood mononuclear cells

研究代表者

木原 進士 (Kihara, Shinji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20332736

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)：食事負荷の前後における末梢血単核球のmRNAマイクロアレイ解析から、食後に生じる酸化ストレスに反応する分子群として、suppressor of cytokine signaling (SOCS)1とSOCS 3および炎症制御分泌蛋白因子A(未発表データ)を明らかにした。これらの因子の測定は、生活習慣病につながる慢性炎症を評価する新たな指標になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on the mRNA microarray analysis of peripheral blood mononuclear cells before and after meal load, we identified suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS 3 and inflammation control secretory protein factor A (unpublished data) as a molecule group responsive to oxidative stress occurring after meal. Measurement of these factors might be expected to become a new index to evaluate chronic inflammation leading to lifestyle-related diseases.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：分析科学 蛋白質 医療・福祉 細胞・組織 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

食事制限が寿命を延長させることは様々な動物種で知られている。霊長類でもカロリー制限で、がん、糖尿病、心臓病などが減少することが報告され、食事が寿命や生活習慣病に作用する機序として、酸化ストレスや転写制御因子の関与が注目されている。

腸管には多数のフローラが共生し、血中リポポリサッカライド (LPS) のレベルはヒトにおいて食事で上昇することが知られている。また LPS 受容体欠損モデルにおいてインスリン抵抗性が改善することから LPS の糖代謝異常への関与が示唆されており、肥満者の末梢血単核球 (PBMC) では酸化ストレスが亢進していることも報告されている。

酸化ストレスは炎症を起こすが、生体は同時に suppressor of cytokine signaling (SOCS) などの炎症抑制分子発現も誘導することにより、炎症反応が進みすぎない機構を働かせている。また SOCS-1 をはじめとする抑制因子の発現は比較的長時間持続するため、通常空腹時採血の PBMC における mRNA 発現レベルが過去の酸化ストレスを反映する可能性がある。

生活習慣病は慢性炎症性疾患とも捉えられ、申請者らはアディポネクチンが抗炎症作用を介して動脈硬化や糖尿病を抑制する機序を明らかにしてきた。しかし、食事によって惹起される炎症反応の制御を担う機構は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

健康寿命を延ばすために、生活習慣病や動脈硬化リスク診断法の確立が、社会的に求められている。従来リスク評価は、血糖や血清脂質などの液性因子と頸動脈超音波検査などの画像検査が中心で、動脈硬化性病変の構成細胞でもある末梢血単核球 (PBMC) を標的にしたものはない。

血中に存在する PBMC は食後の高血糖や高脂血症などにさらされており、PBMC の酸化ス

トレスは血管壁の酸化ストレスより動脈硬化発症に重要であることが動物実験で報告されている。PBMC は、血中で様々な酸化ストレスに反応して、炎症性サイトカインを短時間発現すると共に、SOCS の様な抗炎症分子を長時間発現して炎症反応を調節していると考えられる。食事は酸化ストレス負荷を惹起するが、生体はその負荷を防御する機能を持ち、その防御機構の破綻が生活習慣病につながる、という仮説に基づいて研究を行う。

本研究では、PBMC mRNA のマイクロアレイ解析により、炎症の防御機構に関わる分子群を同定し、早朝空腹時の採血での発現レベルをもって過去の酸化ストレスレベルを評価し、生活習慣病リスク診断法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 食事負荷試験

書面による同意を得た薬物療法を受けていない成人に、12 時間絶食後、テストミール(エネルギー 460 kcal、蛋白質 18 g、脂質 18 g、キューピー社 E460F18) を 100ml の水とともに 15 分かけて摂取してもらい、負荷前、負荷後 30 分、1、2 時間に採血を行った。

血液からリンパ球分離溶液で末梢血単核球 (PBMC) を分離し、RNA を抽出した。PBMC における炎症反応は、定量リアルタイム PCR 法を用いてインターロイキン (IL) -1、IL-6 及び、腫瘍壊死因子 (TNF) - の mRNA レベルにより評価した。血糖、インスリン、HbA1c、LDL-C、中性脂肪、HDL-C、高感度 CRP、AST、ALT、クレアチニン、シスタチン C、リポポリサッカライド (LPS)、アディポネクチンは市販のキットにより測定した。

(2) マイクロアレイ解析

食事による軽度の炎症反応を検討するため、高感度 CRP 0.1mg/dL の場合は解析対象から除外し、食事負荷により血糖と中性脂肪の上昇が共に 40mg/dL 以上認められた 2 名と、共

に 20mg/dL 未満であった 2 名の食事負荷前後の PBMC から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

アジレント社の Human SurePrint G3 (8 × 60K) ver2.0 システムを用い、2 倍以上の変動があった mRNA について、炎症に関与する分子群を中心に解析を行った。マイクロアレイ解析から同定した、炎症の防御機構に関与すると考えられる候補分子群を、対象全員の PBMC において定量リアルタイム PCR 法を用いて評価した。

(3) 統計解析

JMP version 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行い、データは平均 (mean) ± 標準偏差 (standard deviation, SD) values で表し、Paired t-test と Spearman の順位相関係数を用いて解析した。全ての解析において $p < 0.05$ を有意であると判定した。

4. 研究成果

(1) 解析対象者

男性 10 例、女性 30 例、年齢 21.5 ± 1.0 才、体格指数 $20.1 \pm 1.6 \text{ kg/m}^2$ であった。食事負荷前の検査値は、血糖や中性脂肪を含めて全て正常範囲であり、アディポネクチンは $12.4 \pm 4.7 \text{ } \mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 食事負荷による変化

血糖は食事負荷により 30 分で $88.2 \pm 6.5 \text{ mg/dL}$ から $111.1 \pm 22.1 \text{ mg/dL}$ に上昇し、中性脂肪も食事負荷により 2 時間で $70.0 \pm 37.2 \text{ mg/dL}$ から $104.5 \pm 49.6 \text{ mg/dL}$ に上昇した。LDL-C と HDL-C には食事負荷による有意な変化は認められなかった。食後の LPS 上昇と中性脂肪上昇の間には有意な正相関が認められた。

PBMC における炎症性サイトカイン TNF-、IL-1、IL-6 の mRNA 量は、食事負荷によりいずれも有意に増加した。食事負荷による血

清中性脂肪値の変化は TNF- の変化と有意な正相関を示し、血糖の変化は IL-1 の変化と有意な正相関を示した。

(3) マイクロアレイ解析

食事負荷により血糖と中性脂肪が共に 40 mg/dL 以上上昇した 2 名の経時的変化と、 20 mg/dL 未満の上昇であった 2 名の経時的変化と、群間比較のマイクロアレイ解析から、suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 と SOCS3 が同定された。そして SOCS1 や SOCS3 と同様の変動パターンを示し、食前の PBMC において SOCS より大きな変化を示す因子 A を同定した (未発表データ)。因子 A は炎症性サイトカインと拮抗するなど、炎症を制御する作用を持つ分泌蛋白であり、食事負荷によって生じる炎症反応の強度は、食前の因子 A mRNA レベルによって評価できることが示唆された。

(4) 食前 PBMC 発現因子と食後炎症性サイトカインの相関

食前の SOCS1 mRNA 量は、負荷 2 時間後における IL-1 mRNA 量の増加と有意な負の相関を認めた。また、食前の SOCS3 mRNA 量は、負荷 2 時間後における TNF- mRNA 量の増加と有意な負の相関を認めた。対照として選んだ SOCS2 の mRNA 量は、炎症性サイトカイン mRNA の発現変化との間に相関を認めなかった。

以上より、食事負荷によって PBMC に誘導される炎症反応の強度は、食前の SOCS1 および SOCS 3 mRNA レベルに影響を受けることが明らかとなった。従って、食前の PBMC 中の SOCS1 と 3 および因子 A の mRNA を測定することは、生活習慣病リスクの評価につながる事が推察された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

大西すみれ、松本茜、松尾夏海、山本浩靖、木原進士

末梢血単核球の炎症関連遺伝子発現に与える食事負荷の影響

第 62 回日本臨床検査医学会学術集会

2105 年 11 月 21 日

長良川国際会議場 岐阜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木原 進士 (KIHARA, Shinji)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20332736

(2)研究分担者

山本 浩靖 (YAMAMOTO, Hiroyasu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00631201

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()