

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11020

研究課題名(和文) Adiposity変化に強く関連する生活習慣病予測因子の探索 エクソソーム解析

研究課題名(英文) Prediction factors of life-style related disease strongly associated with change of adiposity - analysis of exosome -

研究代表者

西田 誠 (Nishida, Makoto)

大阪大学・キャンパスライフ健康支援センター・特任准教授

研究者番号：00379273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、長期間の体脂肪の変化(BMI・腹囲)と生活習慣病リスクの変化に着目して、新たな生活習慣病予測因子を同定することをめざした。これまで研究してきた老化関連因子の Klotho は、高血糖の出現や心不全の治療反応性に関連することを新たに見いだしたが、経年の体脂肪変化に伴うリスクの増加には有意な関連を認めなかった。10年間保管した凍結血清を用いエクソソーム由来の新規因子の網羅的検索を行ったが、有意なマーカーは同定できなかった。長期間の体脂肪変化に係わるリスク変化の同定にはさらなる検索が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病リスクは中高年に増加する。リスクの増加した人には保健指導を行うが、生活習慣が固定してしまった中高年では長続きする人は少なく結局薬物治療へと移行する。生活習慣が固定していない若年時に将来の生活習慣病リスクが予測できるマーカーがあれば、介入ターゲットを絞って指導し、その介入効果をモニターすることも可能となる可能性がある。そこで本研究では、新たな方法でそのマーカーを探索し、今後の方向性を示した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is identification of new predictive markers for life style-related disease, by using the classification according to long-term changes of the adiposity and the risks of life style-related disease. We have been studying an aging-related factor, klotho, and newly identified the association of klotho with future hyperglycemia and with response to treatment of cardiac failure. However, klotho did not show the long-term association with the changes of adiposity and risks of life style-related disease. Next, comprehensive analysis of exosome derived miRNA was performed in 10 years-cryopreserved serum, but it failed to demonstrate significant markers for long-term changes of risks. Further studies need to identify the new long-term markers for lifestyle related disease.

研究分野：内科 動脈硬化

キーワード：生活習慣病 adiposity エクソソーム 血清マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、健診余剰血清を10年以上蓄積し、生活習慣病リスクに関連する新規マーカーの評価を行ってきた。生活習慣病発症に強く関連する内臓脂肪の蓄積とアディポサイトカイン等に着目、報告し(Circ J. 2007, Cardiovasc Diabetol. 2007)、近年は老化に関連するとされる Klotho と生活習慣病等の関連を検討してきた(Clin Chim Acta. 2018, Sci Rep. 2015)。本研究では、これまでの研究をさらにすすめるとともに、以下の考えのもと、新規因子の網羅的検索を試みた。

生活習慣病の発症には、遺伝的因子と環境因子が関与する。環境因子の影響を強く受ける BMI・腹囲などの adiposity の経年的変化に伴い、生活習慣病関連の検査値は当然変化するが、その変化の少ない人も認められる。そこで本研究においては、adiposity の変化に伴い検査値が変化しない群は、遺伝的に疾患抵抗性が高いと仮定し、この群との比較により、adiposity 変化により強く関連する新規の生活習慣病予測因子を同定する。同定された因子は、より環境因子に影響を受けやすく、実際の治療介入マーカーとして有用である可能性が高い。また逆に adiposity 増加にも関わらず生活習慣病の発症が予防される防御的因子の同定も期待される。

この群間で比較する新規因子の網羅的検索のため臓器間のクロストークに重要とされるエクソソームに着目した。エクソソームは、細胞から分泌される小胞の一種で、細胞中の老廃物を細胞外に廃棄するものと思われていた。しかしその内部に miRNA が含まれることが発見された(Science 2007)ことにより、がんや免疫領域を中心に細胞間コミュニケーションへの役割が解明され、がんの早期マーカーとして実用化されようとしている。疾病患者のエクソソーム miRNA の解析により動脈硬化、肥満、糖尿病等に関連する miRNA は明らかになりつつあるが、その発症以前の検査値悪化リスクとの関連は、この時点では明らかになっていない。エクソソーム内容物は比較的長期間安定とされており、我々が持つ長期凍結保存血清を用い、レトロスペクティブな解析で明らかになる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

凍結保存血清をもちいて、これまで検討してきた生活習慣病関連マーカーの予測因子としての重要性を明らかにするとともに、環境因子の影響を強く受ける BMI・腹囲などの adiposity の経年的変化により検査値が変化する群と変化しない群の比較により、Adiposity 変化により強く関連する新規の生活習慣病長期予測因子を同定する。

3. 研究の方法

対象：大阪大学職員健診で余剰血清の保存、研究利用の同意を得ており、かつ10年間の経過データが得られるもの。

データ：身長、体重、BMI、血圧、立位自然呼気時の臍レベルでの腹囲を計測。
生活習慣病関連アンケート(運動習慣、食生活等)

Adiposity の変化：

BMI：増加群 +0.5 以上 不変群 +0.5-0.5 減少群 -0.5 以下

腹囲：増加群 +5cm 以上 不変群 +5.0-5.0 減少群 -5cm 以下

リスクの増加：

SBP +10mmHg 以上 TG +50mg/dl 以上 Glc +10mg/dl 以上

血清マーカーの測定:ELISA

アディポネクチン、IL6、klotho、BNP

エクソソーム解析：

- ・血清からのエクソソーム分画の分離調整：Tim4 磁気ビーズ法
- ・エクソソーム分画から RNA を調整し、miRNA マイクロアレイによりプロファイルを作成
- ・RT-PCR Control は変動の少ない miRNA-451 を用いる

4. 研究成果

1) 比較的短期間の予測因子としての klotho

表1 (J Gen Med. 14:229-236,2021)

Table 4 Multivariable Logistic Analysis: Risk Factors for High Fasting Plasma Glucose Level

Risk Factors	Odds Ratio	95% Confidence Interval	P-value
Age (per 10years)	1.69	0.56-5.14	0.354
FPG (per 10mg/dl)	9.54*	2.21- 41.1	0.002
saKI (per 100pg/mL)	0.59*	0.38-0.90	0.015

Note: *P < 0.05.

Abbreviations: FPG, fasting plasma glucose; saKI, soluble alpha-Klotho.

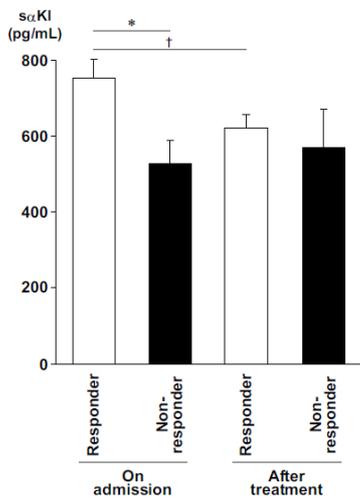


図1 (Sci Rep. 2021)

. Drinking frequency and incidence of hypertension in males

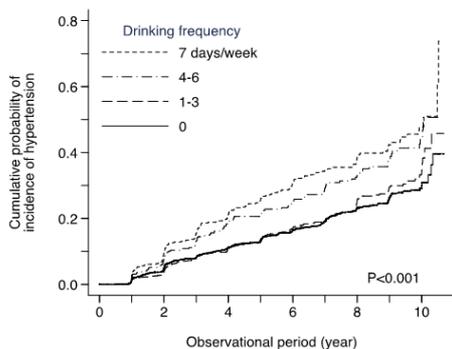


図2 (Hypertens Res. 2020)

表2 Adiposity 変化とリスク変化による群分け (ベースラインデータ)

		BMI不変				BMI増加			
		リスク不変		リスク増加		リスク不変		リスク増加	
n	833	471		32		212		44	
Age	32.1 ± 4.8	32.1 ± 4.8	34.5 ± 5.3	31.8 ± 4.3	31.5 ± 5.3				
BMI	22 ± 3.5	21.5 ± 3	22.9 ± 4.1	21.6 ± 3.4	23.6 ± 4.3				
Waist	75.1 ± 9.7	73.5 ± 8.9	78.3 ± 9.9	74.6 ± 9.4	78.7 ± 11.6				
SBP	112.6 ± 12.5	111.5 ± 12.6	114.9 ± 13	113.1 ± 11.9	109.2 ± 11.6				
DBP	69.7 ± 10	68.6 ± 10.9	72 ± 12	70.1 ± 10.8	70.8 ± 10.3				
TG	84.1 ± 65.5	77.9 ± 62.2	91.8 ± 49	82.7 ± 57.1	82.8 ± 54				
HDL-C	66.5 ± 15.9	67.8 ± 15.9	67 ± 15	66.4 ± 15.7	62.2 ± 14.6				
LDL-C	103.1 ± 27.6	102.7 ± 27.2	111.1 ± 31	98.7 ± 24.6	113.9 ± 30.7				
Glc	85.7 ± 8.9	85.4 ± 8	86.1 ± 11	85.2 ± 7.8	85.6 ± 8.5				
HbA1c	5.2 ± 0.4	5.2 ± 0.3	5.3 ± 0.4	5.1 ± 0.3	5.3 ± 0.3				

表3 Adiposity 変化とリスク変化による群分け (リスク変化)

		BMI不変				BMI増加			
		リスク不変		リスク増加		リスク不変		リスク増加	
n	833	471		32		212		44	
Δ BMI	0.66 ± 1.83	0.22 ± 0.76	0.43 ± 0.7	2.49 ± 0.94	2.87 ± 1.45				
Δ Waist	2.6 ± 6.7	1.5 ± 4.4	2.4 ± 4.4	7.1 ± 7.1	9 ± 5.8				
Δ SBP	4.8 ± 12.5	2.9 ± 12.5	17.1 ± 7.5	5.3 ± 10.9	19 ± 9.8				
Δ TG	3.4 ± 58.1	-1.4 ± 47.8	49.4 ± 80	9 ± 46.9	70.7 ± 79.2				
Δ HDL-C	-3.2 ± 11.2	-2.5 ± 10.8	-6.5 ± 9.9	-5.6 ± 11	-10.2 ± 7.8				
Δ LDL-C	16 ± 24.4	13.3 ± 23.2	15.7 ± 21	23.8 ± 20.5	19.7 ± 29.5				
Δ Glc	1.8 ± 7.9	1.1 ± 7.5	8.7 ± 12	2.3 ± 7.2	7.7 ± 7.3				
Δ HbA1c	0.06 ± 0.3	0.03 ± 0.25	0.19 ± 0.4	0.15 ± 0.31	0.18 ± 0.24				

3) エクソソーム解析

我々はこれまで klotho と炎症等との関連を示してきたが、今回予測因子としての有用性を検討した。表1に示すように3年後の高血糖を予測する有意な因子であることが明らかとなった。また、図1に示すように、心不全入院で治療反応性の良い群は入院時の klotho 値が高く、心不全予後の短期的な予測因子として有用である可能性が示された。

2) Adiposity 変化に基づく長期予測因子
本研究の対象集団は、図2に示すように10年間の経過をみると、ベースラインのアルコール摂取頻度が高くなると、その後の高血圧発症頻度が高くなること示された。しかし、短期間で有用性が示された klotho は、長期間での有意な関連が示されなかった。

そこで、Adiposity 変化とリスク変化に基づいて表2のように群分けを行った。ベースラインの年齢、BMI、腹囲、LDL-C、HbA1c が、リスク増加群で有意に高値となっていたが、その他のリスクに群間の有意差はみられなかった。

表3に示すように、この4群で、10年間のリスク変化をみると、BMI 増加群でよりリスクの悪化が認められた(腹囲を用いても同様)。これまでの検討では、BMI の増加度とリスクの増加度について、短期間では有意な相関がみられたが、10年の長期間では相関がみられず、adiposity に関連したマーカーは長期の予測因子とはならない可能性を考えていたが、この分類により、adiposity に関連する長期の予測因子が同定できる可能性が示された。

この4群間での比較で、Adiposity 変化に伴う生活習慣病の新たな長期予測因子の同定を目指したが、10年間以上保管した凍結血清を用いるとエクソソーム内 miRNA は、サンプルにより大幅に減少していた。そしてこのサンプルで網羅的解析を行ったが有意な結果は得られなかった。マウス血清で条件を変えて検討すると、凍結再解凍の条件でエクソソーム内 miRNA が大幅に減少したことから、凍結血清保存の条件が統一できていなかった可能性を考えた。

5) 今後の展開

これまでの研究で生活習慣病との関連が示されている m1273, m122 などが、長期の生活習慣病リスク予測因子となりうるかどうか、凍結再解凍をおこなっていない保存血清で検討を行とともに、前向き研究の準備を行う。そのなかで Adiposity と深く関連するが有効な介入ターゲットが明らかでない HDL 上の因子、および T 細胞を中心としたマーカーについても解析を進めていく。これらの研究成果により、有用な長期生活習慣病予測因子が明らかになればターゲットを絞った若い世代からの積極的な生活習慣介入および介入効果の判定が可能になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakanishi Kaori, Nishida Makoto, Yamamoto Ryohei, Koseki Masahiro, Moriyama Toshiki, Yamauchi-Takahara Keiko	4. 巻 476
2. 論文標題 An implication of Klotho-related molecules in different smoking-related health outcomes between men and women	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 44 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2017.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Kaori, Nishida Makoto, Taneike Manabu, Yamamoto Ryohei, Adachi Hiroyoshi, Moriyama Toshiki, Yamauchi-Takahara Keiko	4. 巻 67
2. 論文標題 Implication of alpha-Klotho as the predictive factor of stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Medicine	6. 最初と最後の頁 1082 ~ 1086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jim-2018-000977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okada Takeshi, Ohama Tohru, Takafuji Kazuaki, Kanno Kotaro, Matsuda Hibiki, Sairyo Masami, Zhu Yinghong, Saga Ayami, Kobayashi Takuya, Masuda Daisaku, Koseki Masahiro, Nishida Makoto, Sakata Yasushi, Yamashita Shizuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Shotgun proteomic analysis reveals proteome alterations in HDL of patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2019.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishigaki Daiki, Yamamoto Ryohei, Shinzawa Maki, Kimura Yoshiki, Fujii Yoshiyuki, Aoki Katsunori, Tomi Ryohei, Ozaki Shingo, Yoshimura Ryuichi, Taneike Manabu, Nakanishi Kaori, Nishida Makoto, Yamauchi-Takahara Keiko, Isaka Yoshitaka, Moriyama Toshiki	4. 巻 43
2. 論文標題 Body mass index modifies the association between frequency of alcohol consumption and incidence of hypertension in men but not in women: a retrospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 322 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0382-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Kaori, Nishida Makoto, Taneike Manabu, Yamamoto Ryohei, Moriyama Toshiki, Yamauchi-Takahara Keiko	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Serum Klotho Levels Contribute to the Prevention of Disease Progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of General Medicine	6. 最初と最後の頁 229 ~ 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IJGM.S291437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西田 誠, 中西 香織, 小関 正博, 種池 学, 山本 陵平, 山下 静也, 守山 敏樹, 瀧原 圭子
2. 発表標題 10年間の腹囲・BMIの変動と危険因子、生活習慣の関連
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴飼 朱美, 山本 陵平, 明石 美智子, 梅野 有希, 川村 淳子, 熊谷 一代, 村井 教子, 姫ヶ迫 由美, 中西 香織, 種池 学, 西田 誠, 瀧原 圭子, 守山 敏樹
2. 発表標題 性別とBMIによって、飲酒による高血圧発症リスクが異なる
3. 学会等名 第56回全国大学保健管理研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 乾 洋勉, 劉 静一, 西田 誠, 常 久洋, 朱 穎広, 冠野 昂太郎, 松田 響, 岡田 健志, 大濱 透, 小関 正博, 山下 静也
2. 発表標題 高コレステロール食誘発心筋梗塞モデルマウスにおけるT細胞の関与の検討
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inui Hiroyasu, Nishida Makoto, Koseki Masahiro, Kanno Kotaro, Okada Takeshi, Ohhama Toru, Yamashita Shizuya, Sakata Yasushi
2. 発表標題 The Role of Th1 and Th17 during Myocardial Infarction and Inhibitory Effect of ProbucoI on Th1 in SR-BI KO/ApoE61h/h Mice
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関