

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11124

研究課題名(和文) 食品が血中microRNAの発現に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Study on the effect of food on the expression of serum microRNAs

研究代表者

鈴木 浩明 (Suzuki, Hiroaki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40344890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、血中microRNA(miRNA)の変化が、食品の機能性のマーカーとなりうるかを目的とした。1つ目は、玄米食と白米食を比較したランダム化比較試験(RCT)で、176種類のmiRNAのうち、4つのmiRNAで玄米群と白米群間に発現の差が認められた。2つ目は、BCAA補充と大豆タンパク補充を比較したRCTで、768種類中16種類のmiRNAで変化が認められ、2種類は、両群で反対に動いていた。2つの試験で変化の認められたmiRNAの一部は、miRNAの発現の変化と代謝状態の変化に相関が認められた。以上から、血中miRNAの変化は、食品の機能性のサロゲートマーカーになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中microRNA(miRNA)の変化は、がん患者でも認められ、特定のがんをターゲットとしたmiRNAのパネルも発売されている。今回の研究成果により、血中miRNAの変化が食品によってもたらされる代謝状態の変化の一部を反映していることが示された。これまで、動物実験や細胞を用いた実験で機能を推定していたが、これらによって示された効果が、必ずしもヒトに投与した場合に再現できないことも多く、血清miRNAによるliquid biopsyは、食品の機能性のみならず、薬品などの機能性を評価するのにも有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine if changes in blood microRNAs(miRNAs) could be a marker of food functionality. In a randomized controlled trial(RCT) comparing a brown rice diet with a white rice diet, significant differences in expression were found between the brown and white rice groups for four of 176 miRNAs. In an RCT comparing BCAA supplementation with soy protein supplementation, changes were observed in 16 of 768 miRNAs, two of which moved in opposite directions in the two groups. For some of the miRNAs that were altered in the two studies, there was a correlation between changes in miRNA expression and changes in metabolic status.

研究分野：応用健康科学

キーワード：血中microRNA 食品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の健康志向の向上に伴い、食品の機能性やサプリメントについてテレビや雑誌などで取り上げられることも増えてきているが、科学的な根拠が不十分なもの(特に、ヒトでのデータ)も多い。これは、food faddism として世界的に問題になっている。ヒトでこれを実証するためには、ランダム化比較試験を行うことが必要であるが、金銭的、人的コストが高い。

MicroRNA (miRNA) は細胞内に存在する長さ 20~25 塩基の noncoding RNA の一種で、ヒトゲノム上に 2000 種類以上の miRNA が見いだされている。miRNA はその標的メッセンジャーRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) を認識して標的 mRNA を不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク産生を抑制する。miRNA は標的遺伝子発現を fine tuning することにより、発生や細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、代謝など広範に影響を及ぼしているといえる。また、miRNA は血中にも存在し、いくつかの病態では特定の血中 miRNA が増加もしくは減少することが知られており、疾患のバイオマーカーとして期待されている。さらに、血中の miRNA が細胞の遺伝子発現制御を行うことも報告されている。したがって、食品の摂取による血中 miRNA の発現の変化から、その食品の持つ作用を推測できることが想定される。

我々は、前糖尿病患者を対象に白米と玄米の体重減少に及ぼす影響を検討したランダム化比較試験を行い、白米群に比べて玄米群で 12 週後に有意に体重、腹囲、small dense LDL が減少することを確認した(1, 2)。それに参加した被験者の血清サンプル各群 10 名分をプールして miRNA を抽出し、血清中に高頻度に認められる 190 種類の miRNA の発現を定量的 PCR パネル (178 種類) と miRNA アレイ (2549 種類) で検討したところ、介入前後で玄米群と白米群で miRNA 発現変化パターンに違いが認められた。また、miRNA アレイで見いだされた玄米特異的に発現が変化する miRNA のうち 54 種類は、機能について報告がされていない miRNA であった。また、定量的 PCR パネルとマイクロアレイで有意な変化の認められた miRNA のうち共通していたものは 3 種類のみであった。これは、解析の手法が異なるためと考えられた。さらに、変化の認められた miRNA で機能が明らかなものの多くは、細胞増殖や癌、動脈硬化、肥満に関連していた。

2. 研究の目的

玄米を始め、これまで健康に良いとされてきた食品の効果を科学的に検証するとともに、これらの食品摂取で発現に変化が認められた miRNA がこれらの食品に特異的なものかどうか確認する。さらに、特異的に変化している miRNA についての機能を解析するとともに、その miRNA 発現に影響を与える栄養成分を探索することを目的とした。

本研究は、ランダム化比較試験 (RCT) のサンプルを用いることが大きな特徴である。単群での解析では、様々なバイアスが入り、miRNA の変化が、介入した食品の効果なのか、それ以外の要因 (試験に参加することで生活習慣が変わるなど) を区別することはできない。ランダム化比較試験が行われたサンプルを利用することで、バイアスを取り除くことができ、より食品に特異的な miRNA を検出することが可能となる。また、短期間でも miRNA の変化を検出できる可能性もあり、食品の効果についての代替エンドポイントとして利用できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 玄米と白米のランダム化比較試験

既に報告されている RCT の保存血清 (2) を用いて miRNA の解析を行った。この研究は、40 歳から 64 歳の過体重の前糖尿病患者を対象に、表面研削玄米と白米の体重と腹囲、糖脂質代謝への影響をみた介入期間 12 週間の RCT である。玄米群では、白米群に比べて、有意に体重および腹囲、LDL コレステロール (LDL-C) と small dense LDL のトリグリセライド (TG) 値が有意に減少した。

(2) 分岐鎖アミノ酸と大豆タンパクのランダム化比較試験

65 歳以上 80 歳未満のインスリンを使用していない 2 型糖尿病患者 38 名をランダムに割り付け、同意撤回 (2 名) と死亡 (1 名) した被験者を除く 35 名を解析対象とした。分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 群 (20 名) には、ロイシン 2g、バリン、イソロイシン各 2g を、大豆タンパク群 (15 名) には 7.5g の大豆タンパクを 1 日 1 回投与した。介入期間は 24 週間。主要評価項目は、骨格筋量、HbA1c の変化量で、副次的評価項目は、骨格筋力、HOMA-IR、抑うつなど。

(3) microRNA 解析

玄米と白米の RCT で得られた血清 36 名分から、miRNA を豊富に含む RNA を抽出した。各群 10 名ずつのプール血清から得られた RNA を用いて miRNA パネル (miRCURY LNA miRNA Focus PCR Panels Serum-Plasma) で変化の認められた miRNA のうち、生物学的重要性と血中の発現量から、以下の miRNA について検討を行った; miR-26a-5p, miR-33a-5p, miR-33b-5p, miR-130a-3p, miR-130b-5p, miR-142-3p。miRNA の発現は、定量的リアルタイム PCR (RT-PCR) で標的 miRNA の発現を定量化した。定量化した miRNA と、体重、腹囲、糖脂質代謝マーカーとの関連について Spearman の順位相関係数で解析した。定量的 RT-PCR による発現変化は、hsa-miR-423 を参照とした

Ct法で解析した。2群の差は、対応のないt-検定で検定した。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

BCAAと大豆タンパクのRCTでは、両群から性別と年齢、体格を考慮した3名を選び、0週と24週の血清からmiRNAを抽出した。これらをmiRNAパネル(miRCURY LNA miRNome Human Panels I and II)で定量PCRを行い、730種類のmiRNAsについて発現の検討を行った。0週と24週のmiRNAの発現の変化量をCt法で検討した。

4. 研究成果

(1) 玄米と白米のランダム化比較試験

血清miRNAの発現の変化量を表1に示す。miR-26a-5pは玄米群で発現が低下、白米群では増加し、両群間で有意差が認められた(0.76 ± 2.47 vs. 1.74 ± 4.00 , $P = 0.040$)。

表1. 玄米群と白米群における血清microRNAの変化量

microRNA	変化量 (倍)		P 値
	玄米群	白米群	
miR-26a-5p	0.76 ± 2.47	1.74 ± 4.00	0.040
miR-33a-5p	0.47 ± 3.48	0.57 ± 2.14	0.595
miR-33b-5p	ND	ND	
miR-130a-3p	0.62 ± 2.38	1.30 ± 4.16	0.089
miR-130b-5p	0.60 ± 2.54	0.56 ± 5.43	0.892
miR-142-3p	1.69 ± 3.07	2.00 ± 3.17	0.672

平均 \pm SD. ND; 発現量が低く十分な解析ができなかった。

miR-26a-5pは、ABCA1やPIK3C2A、PIK3CG、PIK3R4、PTENといったHDL代謝やインスリン細胞内シグナルに係るmRNAを標的にしており、miR-26a-5pの発現変化の違いが、玄米群と白米群で認められた血清TG値およびHDL-C値の差に関与している可能性が考えられた。また、miR-130a-3pはPPAR α やPPAR γ を標的にしており、玄米群で体重や腹囲、LDL粒子中のTGが減少がPPAR α およびPPAR γ の発現亢進による可能性が示唆された。今後、さらにサンプルサイズを増やして検証する必要がある。

(2) BCAAと大豆タンパクのランダム化比較試験

介入前の両群の年齢、性、糖尿病罹病期間、合併症、血圧、空腹時血糖、インスリン、HbA1c、総コレステロール、HDLコレステロール(HDL-C)、LDL-C、TG、推算糸球体濾過量(eGFR)、推定タンパク質摂取量、エネルギー摂取量、活動量、BMI、骨格筋量、膝伸展筋力、膝伸展持久力、握力、抑うつ(QIDS-J)、やる気スコア、認知機能(MMSE)に有意差は認めなかった。糖尿病治療薬については、グリニド薬の使用が大豆タンパク群で有意に多い以外は、治療薬の使用状況に有意差は認めなかった。介入期間中のエネルギー摂取量は、両群ともに有意な変化はなく、両群間に有意差を認めなかった。

BCAA群、大豆タンパク群ともに、介入により、主要評価項目のHbA1c、骨格筋量に有意な変化はなく、2群間にも有意差を認めなかった。

体格指標の変化は、BCAA群、大豆タンパク群ともに、介入前後で、体重、体脂肪率、skeletal muscle mass index (SMI)に有意な変化はなく、2群間にも有意差を認めなかった。

体力指標については、握力と片脚立位時間は、介入によりBCAA群で有意に増加したが、BCAA群と大豆タンパク群で変化量に有意差は認めなかった。一方、膝伸展筋力は大豆タンパク群で有意に増加したが、変化量は2群間に有意差は認めなかった。膝伸展持久力は、BCAA群で有意に低下したが、変化量は2群間で有意差は認めなかった。

抑うつ指標の変化については、BCAA群でQIDS-Jが有意に改善したが、2群間で変化量に有意差は認めなかった。MMSEとやる気スコアは、両群とも介入による有意な変化はなく、変化量も2群間で有意差はなかった。

耐糖能、脂質値、腎機能については、BCAA群でLDL-Cの有意な変化は認めなかったが、大豆タンパク群でLDL-Cが有意に低下し、変化量も2群間に有意差が認められた。尿中アルブミンは、BCAA群で有意に低下し、大豆タンパク群では有意な変化は認めなかったが、変化量は2群間で有意差は認めなかった。空腹時血糖、HOMA-IR、総コレステロール、TG、HDL-C、クレアチニン・クリアランス、タンパク摂取量は、両群とも介入による有意な変化はなく、変化量も2群間で有意差はなかった。各群3名の血清からmiRNAを抽出し、miRNAパネルで評価した結果、2群で差がある傾向が認められたmiRNAは8種類認められた。

(3) まとめ

血中miRNAは、食品の摂取によって変化し、一部は、食品の摂取によってもたらされる代謝状態の変化と関連する遺伝子を標的としていることが明らかとなった。食品による代謝状態の変化は、薬剤に比べて小さく、miRNAの変化も大きくはない。今回は、症例数も少なく、適切なサン

プルサイズの試験で検証される必要があるが、血中 miRNA の変化により、食品の機能性の機序を評価できる可能性が示唆された。

引用文献

1. 荒木 理沙, 松浦 文奈, 藤江 敬子, 中田 由夫, 鈴木 浩明, 橋本 幸一. 表面加工玄米の食べやすさに関する探索的ランダム化クロスオーバー試験. 日本栄養・食糧学会誌. 2016;69:249-255.
2. Araki R, Ushio R, Fujie K, Ueyama Y, Suzuki H, Nakata Y, Hashimoto K. Effect of partially-abraded brown rice consumption on body weight and the indicators of glucose and lipid metabolism in pre-diabetic adults: A randomized controlled trial. Clinical Nutrition ESPEN. 2017;19:9-15.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Araki Risa, Fujie Keiko, Yuine Nanako, Watabe Yuta, Maruo Kazushi, Suzuki Hiroaki, Hashimoto Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 The Possibility of Suppression of Increased Postprandial Blood Glucose Levels by Gamma-Polyglutamic Acid-Rich Natto in the Early Phase after Eating: A Randomized Crossover Pilot Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 915 ~ 915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12040915	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 Araki Risa, Fujie Keiko, Yuine Nanako, Watabe Yuta, Nakata Yoshio, Suzuki Hiroaki, Isoda Hiroko, Hashimoto Koichi	4. 巻 67
2. 論文標題 Olive leaf tea is beneficial for lipid metabolism in adults with prediabetes: an exploratory randomized controlled trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 60 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nutres.2019.05.003	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 荒木 理沙, 藤江 敬子, 渡部 裕太, 唯根 菜々子, 鈴木 浩明, 磯田 博子, 橋本 幸一	4. 巻 96
2. 論文標題 オリーブ葉茶の継続摂取によるヒトの血中脂質濃度改善効果の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 応用薬理	6. 最初と最後の頁 101 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Araki Risa, Fujie Keiko, Nakata Yoshio, Suzuki Hiroaki, Matsui Koichi, Uematsu Katsutaro, Shibasaki Hiroyuki, Ando Takahiko, Ueyama Yukari, Isoda Hiroko, Hashimoto Koichi	4. 巻 71
2. 論文標題 An Exploratory Study of the Effects of Continuous Intake of Olive Leaf Tea on Physique and Glucose and Lipid Metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 121 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4327/jsnfs.71.121	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Araki R, Fujie K, Yuine N, Watababe Y, Nakata Y, Suzuki H, Isoda H, Hashimoto K
2. 発表標題 Health benefits of olive leaf tea for adults with pre-diabetes: An exploratory randomized controlled trial.
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木浩明、荒木里沙、深津佳世子、藤江敬子、関谷元博、中川嘉、松坂賢、中田由夫、矢作直也、橋本幸一、島野仁
2. 発表標題 玄米食における血中microRNAの変化
3. 学会等名 第34回日本静脈経腸栄養学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki H, Araki R, Sasaki-Fukatsu K, Fujie K, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Nakata Y, Hashimoto K, Shimano H
2. 発表標題 Association between brown rice consumption and changes of circulating microRNAs in Japanese subjects with prediabetes
3. 学会等名 55th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 唯根菜々子, 荒木理沙, 藤江敬子, 渡部裕太, 鈴木浩明, 橋本幸一
2. 発表標題 高-poly glutamic acid納豆の単回摂取がヒトの食後血糖変動に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第23回日本フードファクター学会・第12回日本ポリフェノール学会・第15回日本カテキン学会合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒木理沙, 藤江敬子, 唯根菜々子, 渡部裕太, 中田由夫, 鈴木浩明, 松井幸一, 植松勝太郎, 柴崎博行, 磯田博子, 橋本幸一
2. 発表標題 オリーブ葉茶の継続摂取がヒトの健康に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018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
研究 分 担 者	深津 佳世子 (佐々木) (Fukatsu Kayoko) (70338903)	共立女子大学・家政学部・教授 (32608)	

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
---------	---------