

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700693

研究課題名（和文） DNAチップを用いた食後高血糖抑制効果のある食品評価法

研究課題名（英文） Assessment method of food that control postprandial hyperglycemia using a DNA microarray

研究代表者 奥村 仙示（OKUMURA HISAMI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：30322259

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、血糖やインスリン反応の異なる食品の摂取が、末梢血白血球遺伝子発現に影響するかを検討する事である。さらに、食後の状態において白血球の遺伝子発現変化が観察できる。7人の健常な被験者に、無作為交錯試験を行った。試験食として75g糖質を含む、グルコース（GL）、白米（WR）、大麦（BAR）、その対照として水（WAR）を摂取した。血糖値、インスリン、遊離脂肪酸濃度、空腹度・満腹度調査及び、白血球の遺伝子発現を経時的に測定した。発現が1.5倍以上変化した遺伝子数と変動パターンは、GL、WR、BARの間で異なっていた。解糖系と脂肪酸β酸化に関するいくつかの遺伝子はGL、WR、BAR摂取後有意に変化した。この研究において遺伝子発現の白血球プロファイリングは食後の代謝を変化を反映する事が示された。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this study was to elucidate whether intake of foods differed from glycemic and insulinemic responses affect gene expression profiling in peripheral white blood cells (WBC). Furthermore, we observed the time course of gene expression changes in WBC to elucidate the metabolic changes in the postprandial state. In randomized crossover study, seven healthy subjects consumed glucose (GL), white rice (WR) and rolled barley (BAR) containing 75 g of available carbohydrate and water (WAT). Blood glucose, insulin and free fatty acid concentrations, subjective levels of fullness and hunger, and Gene expression profiling in WBC were measured. The number of genes changed more than 1.5-fold and the expression patterns in the time-course were different among the GL, WR and BAR. Several genes involved in glycolysis and fatty acid β-oxidation were markedly changed after intake of the GL, WR and BAR. These genes were not changed at all time points in the WAT. It is concluded from this study that gene expression profiling in WBC can reflect food-related metabolic changes even in the postprandial state.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：臨床栄養学

科研費の分科・細目：応用栄養学

キーワード：生活習慣表

1. 研究開始当初の背景

健康ブームによって食品に対する期待が先行する中「何を」「どのくらい」「どのように」食べれば「何故」良いのか、科学的な根拠は立ち遅れている。健康が多因子的複雑な性質であることや、個々の食物成分がそれぞれ異なる遺伝子経路に影響を与えていることを反映しているためと考えられる。食品は恒常的、恒久的に食べ続けるものなので、もしマイナスの面があるならばそれを極力排除せねばならず、その本質を解析することは必要不可欠である。過去の報告は、動物に対して単一成分を実験的過剰投与したものが多く、期待する疾患予防効果は、複数の物質による複合的な作用で発揮されると考えられ、ヒトの日常の食生活へは応用し難い。機能性食品のコンセプトと特定保健用食品の制度が Nature (D Swinbanks 1993)に「日本は食品と医薬品の協会に踏み込む」と紹介され、食品の持つ機能性が注目されている。ニュートリゲノミクスは新しい科学分野で、これまでに注目してなかった遺伝子の変化が見つければ、我々がこれまでに気付かなかった食事の影響を探るきっかけとなる。つまり、すでにわかっている効果を確認するだけでなく、糖質代謝のメカニズムや免疫への影響等、新たな機能性の発見や安全性の評価につながる。日本食には歴史の中で育まれた健康に寄与すると考えられている多くの秀逸な食材がある。その食品の有効的な食べ方や疾患予防効果などに関する系統的かつ総合的な研究が望まれている。

2. 研究の目的

我々は、耐糖能異常が多い肝硬変患者の生体内代謝異常について明らかにし (Yamanaka H Nutrition 1999)、その異常を改善する食事療法 (Yamanaka H EJCN 2006) や医療のエンドポイントである QOL (Yamanaka-Okumura H Hepatol Res 2010) について研究を重ねてきた。更に研究を進め、主食である白米に粘性のある副菜 (納豆、長いも、おくら) を組み合わせた低 GI 食を探索し、食後高血糖抑制やインスリン節約に効果があること (A Tanighch, H Yamanaka-Okumura ADA 2008)、さらにその長期摂取が脂質代謝や酸化ストレスを低減する効果があること (H Yamanaka-Okumura ICD 2008、奥村 栄養評価と治療 2006) を発表してきた。糖尿病治療に食事療法は必須であるが、その相互間の分子メカニズムは解明されていない。食後血糖値を規定する因子として、消化、吸収、消化管ホルモン、肝臓および末梢のグルコース取り込み等の多くの因子が関与している。トランスクリプトミクスにより、先入観や予備知識



に全くとらわれることなく、客観的かつ総合的な情報を得ることで、低 GI 食効果の科学基盤を解明する。我々は少人数の予備研究として、健常者に 75gOGTT を行い、糖代謝の鍵酵素である PDK4 (ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ) が 2 時間で低下し、4 時間で回復してくることを DNA チップ解析及び real time PCR で明らかにしている。経時的な変化を確認する研究は他になく、食後高血糖の影響を明確にするための極めて重要な研究と位置付けられる。そこで、本研究では

- 1) 今まで評価が困難であったヒトに対する低 GI 食の効果、末梢血白血球遺伝子発現や末梢血バイオマーカーより経時的に評価し、最も検討に適切な時間や項目を決定する。
- 2) 食品摂取で起こる食後高血糖時の生体内での反応を網羅的に評価し、DNA チップを用いた食品評価法を確立する。

3. 研究の方法

被験者に対し事前に健康診断を行い、空腹時血糖値ならびに血清インスリン濃度が正常であることを確認した。喫煙者、肝機能・腎機能に異常がある者、代謝性疾患・消化器疾患の既往がある者は除外した。

本試験は徳島大学附属病院倫理委員会の承認を得て行った。被験者には試験について十分な説明を行い書面による同意を得て行った。

試験食負荷は 2 週間間隔を空けての無作為クロスオーバー方式にて行った。試験 3 日前から、アルコール摂取量を 1 日 20g 以下に制限し、試験前日は欠食、激しい飲酒や運動を禁止し、18 時以降は水と指定の夕食以外の摂取を禁止し、20 時に夕食を摂取した。試験当日は午前 7 時 45 分から安静状態を保った後、空腹時 (0 分) の採血を行った。GL, WR, BAR, WAT 摂取時の血糖値、インスリン、遊離脂肪酸濃度は、30、45、60、90、120、240、360 分後に採血し測定した。DNA チップ解析サンプルは、GL, WR, BAR 摂取時の被験者 7 名の空腹時、試験食摂取後 120、240、360 分の血液サンプルから抽出した。RealTimePCR 用に WAT も追加して採血を行った。

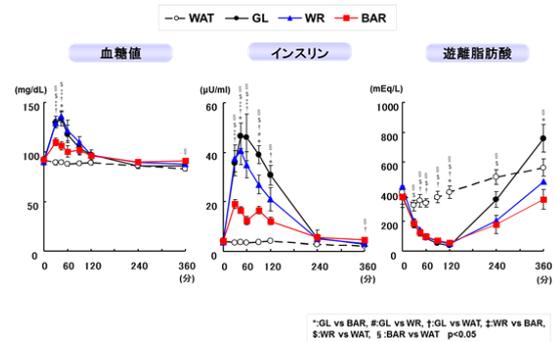
採取された血液は室温で一晩放置した後、抽出に使われるまで -20℃ で保存された。

PAXgene Blood RNA kit (QIAGEN)を用いて、6ヶ月以内に白血球からRNAを抽出した。抽出されたRNAは-80℃で保存された。

DNA使用アレイはAffymetrix社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0とした。抽出されたRNAサンプルはTaKaRaにて、Gene Chip Globin-Reduction Kit (Affymetrix Inc)にしたがって処理された。その後、被験者7名のRNAを等量ずつ混合後、DNAチップ解析に用いた。

測定下限値=Signal値の平均-3×標準偏差よりSignal値の高いプローブセットを抽出しフィルタリングを行った。発現パターンでプローブセットを分類するため、Baseサンプルに対する変動倍率1.5倍の基準に基づいて、Up、Down、No Changeに分類し変動遺伝子を抽出した。

Real Time PCRの結果は、一元配置分散分析後、有意なものに対して、Dunnett法による多重比較を行って解析した。危険率p<0.05を有意とした。なお、すべての統計処理はSPSSにより解析を用いて行った。

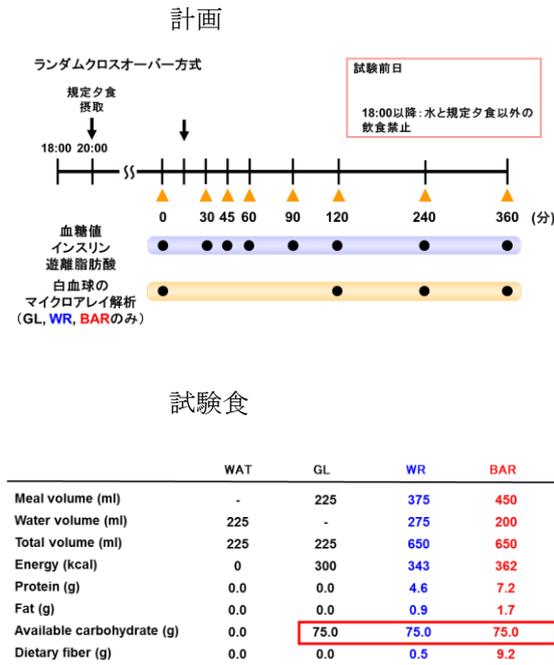


血糖値は、GL、WRにおいて高値を示したが、BARにおいて上昇は抑制された。WATは360分まで変動はみられなかった。インスリンは、血糖値の変動と類似してGL、WRは高値を示したが、BARにおいては分泌が節約された。WATにおいては変動がみられなかった。遊離脂肪酸はGL、WR、BARとも120分まで低下したが、240、360分後は空腹を反映し上昇した。GLにおいては空腹時のレベルよりさらに上昇した。

2) 食品摂取後に1.5倍以上変動のみられた遺伝子の上位5遺伝子

1.5倍以上変動のあった遺伝子

	120min/0min		240min/0min		360min/0min		
	Gene symbol	Fold change	Gene symbol	Fold change	Gene symbol	Fold change	
UP	GL	CD79B	7.16	CD79B	12.68	CD79B	8.07
		GRASP	5.74	SEPT9	9.05	CLPTM1	4.26
		SEPT9	3.92	CLPTM1	7.15	GRASP	3.88
		ANKRD12	3.51	ATP8B2	6.36	ARHGAP24	3.45
		ATP8B2	3.46	AP2B1	5.70	UNG1887	3.36
	WR	KBTBD2	4.56	APP	4.96	APP	4.81
		JDP2	3.75	JDP2	4.13	JDP2	4.42
		SLC39A1	3.68	CYP3A4	3.88	EIF1	4.42
		SEPT9	3.67	SLC4A7	3.32	G0S2	4.07
		OAF	3.27	PRR11	3.09	SEPT9	3.48
BAR	CLDN19	5.91	SETD8	6.81	SETD8	6.13	
	SETD8	4.68	CLDN19	4.29	CLDN19	4.90	
	SIVA20W2	3.62	RPS36K2.1	4.19	LRRC37A3	4.08	
	LOC643287	3.50	LRRC37A3	3.82	GRAP2	3.54	
	GRAP2	2.89	GRAP2	3.74	ZFY	3.09	
DOWN	GL	SLC25A42	0.09	LOC100132288	0.06	LOC161527	0.11
		RAD54L2	0.18	CRTPA	0.14	LRDD	0.16
		SETD8	0.25	LVZ	0.18	BAZA	0.19
		PDK4	0.32	BCAS4	0.18	BAZA	0.23
		PTK6	0.33	ATP6V1A	0.22	RAP1GAP	0.27
	WR	TNNT3	0.18	BCAS4	0.13	POLM	0.21
		MBLAC1	0.23	ATP2A3	0.26	GAMT	0.22
		LRDD	0.23	LVZ	0.28	HOCK2	0.26
		SLC25A42	0.24	SBLEC10	0.29	LOC643287	0.31
		CR1	0.25	PFID	0.29	PTK6	0.32
BAR	C6orf150	0.13	BAZA	0.14	ALOX15	0.09	
	TRABD	0.16	ATF7	0.17	USF2	0.14	
	ATXN1L	0.20	AGBL5	0.25	LOC493754	0.14	
	ATF7	0.21	ARHGAP24	0.26	TNNT3	0.18	
	ZNF563	0.33	UBE2NL	0.29	C10orf97	0.27	



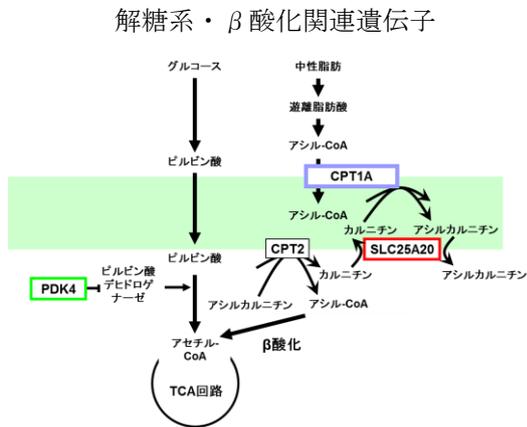
4. 研究成果

食品負荷後のヒトの白血球において、低侵襲で遺伝子発現を確認できる可能性が示された。

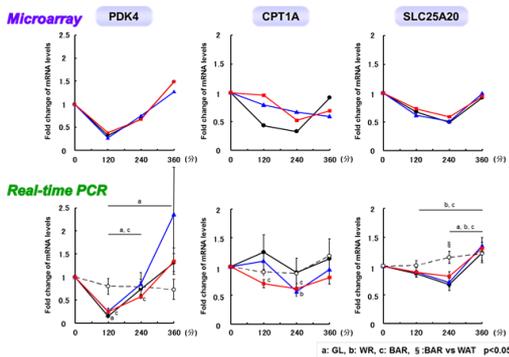
1) 食品摂取後の血糖値、インスリン、遊離脂肪酸濃度の経時的な変動

3) エネルギー源を糖質から脂質へ変換するPDK4, β酸化に関連する遺伝子のCPT1A及びSLC25A20は、摂食後には解糖系、TCA回路が進むことにより遺伝子発現が低下し、時間が経て空腹時の代謝へと移行することに伴い、遺伝子発現の上昇がみられた。

試験食摂取後 1.5 倍以上変動のあった遺伝子のうち PDK4(pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4) 、 CPT1A(carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)) 、 SLC25A20(carnitine/acylcarnitine translocase)の経時的変動



マイクロアレイと Real TimePCR の結果



以上の事から、食後の代謝変化による影響が、白血球遺伝子発現に反映されることが示唆された。摂食や飢餓に対する反応は、血清 NEFA と同じ時間に、mRNA の遺伝子が示す解糖系・β酸化関連遺伝子の変動がみられた。

しかしながら、これら3遺伝子に関しては、GI 値の異なる食品による差が見られなかった。

近年、食生活の乱れなどが原因で発症する生活習慣病が社会的関心を集めるようになり、日常の食生活を改善することで健康を維持したいという、人々の強い願望が膨らんでいる。すでに確立されているヒト試験のノウハウを活かし、根拠がなく経験的・迷信的に信じられていた「食事」について網羅的に評価し、社会的ニーズに応じていきたいと考えている。

1) 食品は薬剤と違い、変化が微量で恒常性

の中で相殺され評価しにくいとされてきた。単一成分の評価に加え、複数栄養素であり食生活に実践できる「献立」の評価法を確立する。

2) 国内唯一の医学部を基盤とする栄養学科で附属病院を併設した環境において、患者から健康者まで、短期的及び長期的にヒト試験を行うシステムが構築されている。

3) 健常、肥満、耐糖能異常、糖尿病等、それぞれの状態に対する低 GI 食の効果と分子機構を解明し、様々な食品を用いるテーラード栄養管理のためのニュートリゲノミクス評価を行うことが可能になる。

本研究は、単一栄養素機能の評価に加え、複数栄養素すなわち主食、主菜、副菜の揃った日本人が一般的に摂取している献立を科学的に評価する方法の確立へ発展させていく基礎的な研究と位置づけられる。

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)

[学会発表](計3件)

1) 川上由香、奥村仙示、森由佳、足立知咲、佐久間理英、武田英二 DNA チップを用いた食品負荷による食後高血糖の網羅的遺伝子発現評価 第14回日本病態栄養学会 平成23年1月15-16日 横浜

2) 奥村仙示 (シンポジウム) 「食事組成の違いが食後高血糖上昇および代謝に及ぼす影響」 第14回日本病態栄養学会 平成23年1月15-16日 横浜

3) Y Kawakami, H Yamanaka-Okumura, M Sakuma, Y Matsumoto, T Sato, E Takeda (2010) Gene expression profiling of human peripheral blood is affected by the differences in glycemic and insulinemic responses to food intake. 32th ESPEN congress, Nice, France, September 5-8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 仙示 (OKUMURA HISAMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：30322259