

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：84305
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790538
 研究課題名（和文）肥満代謝症候群の脂肪酸分画と単球機能に着目した動脈硬化早期診断法の確立
 研究課題名（英文）Establishment of the evaluation of early development of atherosclerosis in obesity and metabolic syndrome -focus on the fraction of fatty acid and function of monocytes-
 研究代表者 佐々木 洋介 (Yousuke Sasaki)
 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

研究成果の概要（和文）：

本研究により、1050 例の肥満・糖尿病・メタボリック症候群の前向きコホートにおいて、各脂肪酸摂取量や血中濃度が既知の心血管病リスク指標や末梢血単球機能と強く関連していることが明らかになった。また、高脂血症薬・Eicosapentaenoic acid 投与により、脂肪酸分画濃度と単球機能の改善を認め、その作用機序を解明した、更に、脂肪酸分画及び単球機能改善の反応性に影響する遺伝子多型について検討している。研究結果より脂肪酸分画と単球機能の測定による早期動脈硬化進展の検出や心血管病予防・治療戦略の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have elucidated that the fraction of fatty acids was significantly associated with the known cardiovascular risks and the function of peripheral blood monocytes (inflammatory M1 type and anti-inflammatory M2 type) in Japanese patients with obesity and metabolic syndrome from 1050 subjects in the database of National Hospital Organization. In addition, we have clarified the anti-inflammatory effect and its mechanism of eicosapentaenoic acid (EPA) on unfavorable M1/M2-like phenotypes of monocytes in obesity. Now, we are elucidating the single nucleotide polymorphisms which affect the fraction of fatty acids and phenotypes of monocytes. Accordingly, these data suggests the usefulness of the measurement of the fraction of fatty acids and phenotypes of monocytes for early detection of atherosclerosis and the prevention of cardiovascular diseases in obesity and metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査医学

キーワード：医療・福祉、内科、臨床、動脈硬化、脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

我が国でも急増する内臓肥満を基盤としたメタボリック症候群 (MetS) は、心血管病 (CVD) の高リスク群であり、その分子機構の解明に基づく新しい治療戦略の確立は最重要課題である。

最近、動脈硬化病変と同様に、肥満の脂肪組織でも、マクロファージ (M ϕ) が侵入し炎症を惹起する事が報告され、肥満に伴う内臓脂肪の炎症・サイトカイン産生や M ϕ 浸潤の増加 (量的変化) が注目されている (J. Clin. Invest. 112, 2003)。また、M ϕ には炎症を惹起する活性化 M1 M ϕ と抗炎症反応に働く非活性化 M2 M ϕ が存在すると報告された (Trends. Immunol. 23, 2002)。非肥満マウスの脂肪組織中 M ϕ は M2 状態であり、高脂肪食負荷により M2 から M1 M ϕ に転換され炎症が惹起され (J. Clin. Invest. 117, 2007)、M ϕ の量的変化に加え、この質的变化の重要性が示された。しかし、MetS の CVD 予防における単球・M ϕ 機能・質的变化の病態意義は不明である。近年、飽和脂肪酸やトランス型脂肪酸の摂取過多が、虚血性心疾患のリスクを有意に高めることが報告されている (N. Engl. J. Med. 20, 1997)。飽和脂肪酸を含む遊離脂肪酸は、骨格筋のインスリン抵抗性や膵ラ氏島 β 細胞における脂肪毒性をもたらす。また、内臓脂肪に由来する遊離脂肪酸は門脈を介して直接肝臓に流入し、インスリン抵抗性や脂肪肝、非アルコール性脂肪肝の発症に関与すると報告されている (J. Clin. Invest. 106, 2000, Cell Metab. 1, 2005)。しかし、これまで炎症性メディエータとしての遊離脂肪酸の分子機構と M ϕ 機能への影響について報告はない。

一方、不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸の炎症惹起作用を減弱しうる。また、疫学調査から魚油や ω 3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の CVD 予防効果が報告されている。最近、大規模研究にて ω 3 PUFA である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. 369:1090, 2007)。申請者らは、既に肥満・MetS において、EPA 投与により動脈硬化惹起性リポ蛋白 small dense LDL、接着因子や炎症・動脈硬化指標が改善し、アディポネクチンが上昇する事を認め (Diabetes Care 2007, ATVB 2007, 2008, Hypertens Res, 2009)、脂質の質の重要性を報告した。一方、 ω 6 PUFA のアラキドン酸 (AA) は血小板凝集能を上げ血栓を作り、動脈硬化を惹起しやすい。よって、CVD 予防には総脂肪摂取量のみならず、脂肪の質・脂肪酸分画 (飽和/不飽和脂肪酸比、EPA/AA 比) に着目した脂質管理が有効と考えられるが、十分な EBM や治療指針は確立されていない。また脂質の質の各 CVD リスクや単球機能・質的变化 (M1/M2 比) への

影響は不明である。申請者らは、脂肪細胞と M ϕ の共培養系を確立し、脂肪細胞・M ϕ 相互作用による「悪循環」(脂肪組織リモデリング) を提唱した (ATVB 25:2062, 2005)。このパラクリン調節系では、M ϕ により活性化された脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸が炎症性メディエータとして作用することを報告し、この作用の一部は自然免疫に関与する LPS の受容体 Toll-like receptor 4 (TLR4) の TLR4/NF- κ B 経路を介すること、 ω 3 PUFA は飽和脂肪酸に拮抗することを細胞レベルで証明している (ATVB. 27, 2007)。一方、遺伝子操作マウスより TLR4 が動脈硬化症に関与することが証明され (PNAS 101, 2004)、実際我々も TLR4 変異マウスではこのパラクリン調節系の「悪循環」が消失することを確認した (ATVB. 25, 2005)。臨床的にも TLR4 の遺伝子多型と動脈硬化との関係が想定される (N. Engl. J. Med. 347, 2002)。しかし、ヒトの TLR4 の内在性リガンドや遊離脂肪酸への感受性の遺伝素因は不明である。

申請者は連携研究者 (京都医療センター・佐藤哲子ら) と約 700 例の多施設共同肥満症/MetS データベース (体組成、内臓脂肪、糖脂質、ホルモン、炎症・動脈硬化指標等) を構築し、既にレプチン/アディポネクチン比と脈波伝播速度 (PWV) との有意な相関 (Diabetes Care 27, 2004)、糖尿病薬や EPA の接着因子、酸化ストレス、PWV 改善効果 (Diabetes Care 26, 2003, Metabolism 55, 2006) など報告し、各 CVD リスクの治療指標としての有用性も明らかにした。また、減量や薬物治療の長期的縦断解析も可能である。更に、FACS/MACS を用いたヒト単球機能の解析系を確立し、肥満・糖脂質関連候補遺伝子 272 遺伝子 712 SNPs の SNPs (遺伝素因) について検索可能である。

現在、単に脂質の量 (LDL-C 値) を低下させるだけでは CVD 予防は不完全であると言われ、脂質の質の改善が注目されている。また単球も量のみならず質 (M1/M2 比) が注目されている。そこで本研究では、以上の学術的背景と成果を踏まえこの前向きコホート集団を背景に、肥満症・MetS の CVD 進展における、各脂肪酸分画 (脂肪酸バランス (SMP 比、EPA/AA 比) と単球機能 (M1/M2 比) の病態意義 (脂肪単球血管連関) と測定意義を明らかにし、「肥満代謝症候群の脂肪酸分画と単球機能に着目した動脈硬化早期診断法の確立」を目指す研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

近年、心血管病 (CVD) 予防の為には、脂質の量 (LDL-C 値) の低下のみならず、脂質の質の改善が注目されている。動脈硬化進展に

関与する単球・マクロファージも量のみならず質 (M1/M2 比) が注目されている。また肥満・MetS では、飽和脂肪酸の摂取過多による CVD 発症率上昇が、一方 EPA などの不飽和脂肪酸による CVD 発症予防が報告され、脂肪酸分画に着目した脂質管理 (飽和/不飽和脂肪酸比) が重要と考えられるが、作用機序や十分な EBM・治療指針は不明である。

本研究では、是までに構築した肥満・MetS の前向きコホート集団を背景に、肥満・MetS の CVD 予防における、各脂肪酸分画・脂肪酸バランス (SMP 比, EPA/AA 比) と単球機能 (M1/M2 比) の関連や病態意義 (脂肪単球血管連関) および測定意義を明らかにすることを目的に、「肥満代謝症候群の脂肪酸分画と単球機能に着目した動脈硬化早期診断法の確立」を目指す。

臨床研究として、肥満・代謝症候群における下記を明らかにする。

(1) 栄養調査による各脂肪酸摂取量・各脂肪酸の血中濃度と単球機能との関連、各々の CVD 予知指標としての意義

(2) 減量・薬物治療、EPA 投与による各脂肪酸分画と単球機能の改善効果とその分子機序

(3) 各脂肪酸の効果の反応性や単球機能に影響する遺伝子多型

基礎研究として、脂肪細胞や肥満モデル動物を用いて、各脂肪酸の代謝調節分子・産生調節機構や動脈硬化進展機序を明らかにする。

以上より、肥満・代謝症候群における脂肪酸や単球の質の病態意義を明らかにし、肥満・MetS の脂肪酸分画・単球機能に着目した新規動脈硬化診断法と治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 各脂肪酸摂取量と心血管病 (CVD) リスクとの関連

肥満症 104 例を対象に、簡易調査票 (摂取食品を各栄養素別に分類・カロリー換算できる表) を用いて、総カロリー、食事内容、各栄養素摂取量や、脂肪酸のバランス (SMP 比) の算出を行った。さらに体組成、糖脂質、内臓/皮下脂肪量、レプチン、アディポネクチン及び MetS 重症度の測定を行い、それらの関連性を検討した。

(2) 肥満・MetS の各脂肪酸血中濃度と CVD リスク及び末梢血単球機能との関連

申請者らが構築した肥満・糖尿病・MetS データベースに登録された 1050 例を対象に、ヒト単球の採取とその機能解析により、日本人肥満・糖尿病・脂質異常症における単球機能 (炎症 M1・抗炎症 M2 マーカーなど質的異

常) と既知の心血管病 (CVD) リスクとの関連について検討した。

(3) EPA 投与による各脂肪酸分画濃度と単球機能の改善効果とその分子機序

肥満合併高脂血症 56 例を対象に、無作為割付にて高脂血症薬・EPA (1.8g/day) を 3 ヶ月間投与する群と、追加投与を行わない対照群に振り分け、血中 EPA/アラキドン酸比 (EPA/AA 比) や単球機能の変化を検討した。

(4) 脂肪酸分画及び単球機能改善の反応性に影響する遺伝子多型の検討

肥満症 500 例を対象に、被験者の白血球よりゲノム DNA を抽出し、脂肪酸の標的分子と想定されている acetyl-CoA 合成酵素、核内受容体、G 蛋白質共役型受容体、TLR ファミリー遺伝子多型、肥満関連候補遺伝子 272 遺伝子 712 SNPs (GLUT4, APM1, LOX1, ICAM1, TNF α など) 及び酸化・リポ蛋白関連 SNPs (アポ B, E, SAA 等) を、TaqMan 法で網羅的に解析する。各 SNPs 多型別脂肪酸分画・単球機能・動脈硬化度及び治療反応性に対する遺伝的要因の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 各脂肪酸摂取量と心血管病 (CVD) リスクとの関連

血中アディポネクチンは肥満症患者の肉摂取率と有意な負相関を、魚摂取率と正の相関傾向を認めた。以上より、肉類の摂取過多、魚類の摂取低下など食事バランスの悪さが低アディポネクチン血症など CVD リスクに影響する可能性が示された。

(2) 肥満・MetS の各脂肪酸血中濃度と CVD リスク及び末梢血単球機能との関連

肥満の末梢血単球では、M1 マーカー (TNF α , IL-6) 発現上昇や M2 マーカー (IL-10, CD163) 発現低下、糖尿病や脂質異常症では単球中 IL-10 の低下を認めた。PWV には年齢と低 CD163 が独立して関連し、単球 M1/M2 の質的变化の動脈硬化への関与が考えられた (Diabetes Care 33:e7, 2010)。最近、JELIS によりエイコサペンタエン酸 (EPA) の CVD 発症抑制作用が報告され、そのサブ解析では EPA / アラキドン酸 (AA) 比が心血管病発症抑制と関連すると報告された (Cir J, 2009)。今回、肥満症患者にて血中 EPA/AA 比が末梢血単球における炎症性サイトカインである TNF α と有意な負の相関を、IL-6 と負の相関傾向を認めた。また、抗炎症性サイトカインである IL-10 と正の相関傾向を認めた。さらに、IL-10 と動脈硬化指標・PWV との有意な負の相関を認めた (Diabetes Care, in press, 2012)。

(3) EPA 投与による各脂肪酸分画濃度と単球機能の改善効果とその分子機序

肥満症において、EPA の 3 ヶ月投与による血中 EPA/AA 比の上昇と末梢血単球 IL-10 の改善に有意な相関を認めた。さらに IL-10 の改善は、PWV の改善に有意に関連していた。更に、ヒト単球系細胞株・THP-1 細胞において、EPA 投与による IL-10 の発現上昇を認め、その効果は阻害剤や siRNA の実験より、PPAR γ を介する可能性が示唆された (Diabetes Care, in press, 2012)。

(4) 脂肪酸分画及び単球機能改善の反応性に影響する遺伝子多型の検討

現在、肥満 500 例において、肥満・脂質関連候補遺伝子 272 遺伝子 712 SNPs の遺伝子型タイピングが終了し、脂肪酸分画・単球機能・動脈硬化指標との関連を解析中である。

以上、肥満・糖尿病・MetS における脂肪酸分画と単球機能改善に着目した早期動脈硬化進展の検出や心血管病予防・治療戦略の可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Koji Hasegawa K, and Ogawa Y. Diabetes Care, 査読有, in press, 2012
- ② Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, Sasaki Y, Yamakage H, Yamada K, Suganami T, and Ogawa Y. Unbalanced M1/M2 Phenotype of Peripheral Blood Monocytes in Obese Diabetic Patients: Effect of Pioglitazone. Diabetes Care, 査読有, 33, 2010, e7.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 佐々木洋介, 浅原哲子, 村中和哉, 椽谷真由, 姫野亜紀裕, 山陰一, 河野茂夫, 島津章. 肥満・2 型糖尿病患者における末梢血単球 M1/M2 タイプに対するピオグリタゾンの効果. 第 32 回日本肥満学会, 2011 年 9 月 23-24 日, 兵庫.
- ② 浅原哲子, 佐々木洋介, 椽谷真由, 姫野亜紀裕, 村中和哉, 山陰一, 小島真司, 河野茂夫, 和田啓道, 長谷川浩二, 島津章. 脂質代謝異常合併肥満症における EPA 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 32 回日本肥満学会, 2011 年 9 月 23-24 日,

兵庫.

③ 姫野亜紀裕, 浅原哲子, 佐々木洋介, 村中和哉, 後藤伸子, 田中智洋, 椽谷真由, 勝浦五郎, 中尾一和, 島津章. 高脂肪食または高炭水化物食負荷がもたらす糖脂質代謝異常の差異の検討. 第 32 回日本肥満学会, 2011 年 9 月 23-24 日, 兵庫.

④ 浅原哲子, 佐々木洋介, 椽谷真由, 姫野亜紀裕, 村中和哉, 山陰一, 河野茂夫, 島津章. 肥満・メタボリック症候群におけるエイコサペンタエン酸による末梢血単球 M1/M2 タイプへの影響と抗動脈硬化作用. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011 年 5 月 19-21 日, 北海道.

⑤ 姫野亜紀裕, 浅原哲子, 田中智洋, 佐々木洋介, 村中和哉, 椽谷真由, 山田伸子, 勝浦五郎, 中尾一和, 島津章. 高脂肪食または高炭水化物食負荷によるメタボリックパラメータの変化—エネルギー組成の差異がもたらす糖脂質代謝異常の検討—. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011 年 5 月 19-21 日, 北海道.

⑥ 佐々木洋介, 佐藤哲子, 姫野亜紀裕, 椽谷真由, 村中和哉, 山田和範, 菅波孝祥, 小川佳宏, 島津章. 肥満・メタボリック症候群の末梢血単球 M1/M2 タイプに対するエイコサペンタエン酸の効果. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010 年 5 月 27-29 日, 岡山.

⑦ 佐藤哲子, 姫野亜紀裕, 椽谷真由, 佐々木洋介, 村中和哉, 山田和範, 菅波孝祥, 小川佳宏, 島津章. 肥満・2 型糖尿病の心血管病リスクとしての末梢血単球 M1/M2 phenotype の病態意義の検討—ピオグリタゾンの効果—. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010 年 5 月 27-29 日, 岡山.

⑧ Satoh-Asahara N, Sasaki Y, Muranaka K, Yamada K, Suganami T, Ogawa Y, Shimatsu A. Pioglitazone Improves Unbalanced M1/M2 Phenotypes of Peripheral Blood Monocytes in Obese Diabetic Patients. The 14th Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism, 2010 年 4 月 1 日, 奈良.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 洋介 (Yousuke Sasaki)

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

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

佐藤 哲子 (Noriko Satoh)
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・臨床代謝栄養研究室長
研究者番号：80373512

長谷川 浩二 (Koji Hasegawa)
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 展開医療研
究部・部長
研究者番号：50283594

小川 佳宏 (Yoshihiro Ogawa)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究
科 分子内分泌内科学分野・教授
研究者番号：70291424