

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658111

研究課題名（和文）

寝たきり動物モデルの確立と寝たきりからの復帰促進食品成分に関する分子栄養学的研究

研究課題名（英文） Establishment of confined rat model “Netakiri” and molecular nutrition to recover from “Netakiri”

研究代表者

小田 裕昭 (Hiroaki Oda)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20204208

研究成果の概要（和文）：

これまでヒトの寝たきり状態を再現することができる動物モデルがなかったため、私たちは動物の簡易固定装置であるボールマニケージを使って、実験的寝たきり動物モデルを開発した。この寝たきり動物モデルを用いて寝たきり状態からの復帰を促進する食品成分の探索を行う基礎実験を行った。この寝たきりモデルにおいて、体の中で何が起きているかを探索するため、肝臓遺伝子発現をマイクロアレー法により検討した。

寝たきりラットモデルにおいて、血中コレステロール濃度が増加することを確認した。また、寝たきりラットにおいて、肝障害マーカーである血中 ALT、AST の活性が増加することを確認した。この血清コレステロール濃度の増加は肝臓からの VLDL コレステロールと VLDL 中性脂質の放出速度の増加であることがわかった。肝臓トランスクリプトミクス解析から、肝細胞の増殖、アポトーシスに関連する遺伝子群の変化が認められた。この遺伝子の変化は、肝障害がこれらの遺伝子発現を介した結果として起きた可能性を示している。また、含硫アミノ酸代謝の遺伝子発現にも変化が見られた。この含硫アミノ酸代謝の変動が、コレステロール・胆汁酸代謝を変動させた結果、血中コレステロール濃度を低下させたと考えた。また、対照群のえさとして用いたカゼインと比較して、卵白タンパク質や大豆タンパク質は血中コレステロール濃度の増加を抑えた。さらに、大豆タンパク質は寝たきり状態で起きる肝障害も完全に抑制することがわかった。これらの結果は食餌タンパク質などの食餌因子により寝たきり状態で起きる脂質代謝異常や肝障害を抑制することができることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Bed rest confined condition, so called in Japanese “Netakiri” has been an important social issue in Japan. It is difficult that “Netakiri” people return to an independent lifestyle. Then we thought to look for food stuff to accelerate recovery from “Netakiri” condition. To do these experiments, we have established confined rat model which is similar to “Netakiri” human.

“Netakiri” rat model showed hypercholesterolemia and liver injury. The secretion rate of VLDL-cholesterol from liver was increased in “Natakiri” rats as compared to controls. The increased secretion of VLDL would explain the hypercholesterolemia. DNA microarray analysis indicated that genes related to cell cycles and apoptosis are changed. These result might explain the liver injury. Gene expression related to sulfur-containing amino acid metabolism was also changed. This change led to abnormal cholesterol or bile acid metabolism. The changed cholesterol and bile acid metabolism would lead hypercholesterolemia. Dietary egg white protein suppressed the hypercholesterolemia induced by “Netakiri” condition. And soy protein isolate suppressed both hypercholesterolemia and liver injury. These indicate that some dietary factors can ameliorate metabolic abnormality and liver injury induce by “Netakiri” condition.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：寝たきり、脂質代謝、肝障害

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において、病態とは異なる寝たきりになる人が増加している。平均寿命が延びたとしても最期の何年かは介護が必要な寝たきりになっていることがわかってきた。そのため健康寿命という考えが提案されてきた。健康寿命を平均寿命にいかに近づけるかが新たな目標と考えられるようになった。

高齢者は強度の運動不足になっていることも多い。寝たきり状態や強度な運動不足は、廃用性症候群と呼ばれ、いったん寝たきりになると、急速に衰え、復帰するのが困難である。つまり、寝たきり状態そのことが体に影響を及ぼしていることが想像されてきた。しかし、臨床現場では寝たきりの原因になった病因の専門医師が診るため、寝たきりそのものを診ることはされてこなかった。寝たきり状態は、その人の「生活の質」を著しく低下させる。そのため、寝たきりからの復帰を目指す栄養学、薬の開発、リハビリ法の開発は急務である。現在のところ、このような物は何一つ開発されていない。この原因は、動物実験モデルが存在しないため、体の中で何が起きているかなど分子生物学的研究が全くされていないことにある。ヒトでこれまでわかっている寝たきりによって起きる症状は、表面的に現れる症状だけを対象にしており、血清生化学データもほとんど報告されていない。寝たきり動物モデルを用いることにより、寝たきりで起きる全身的異常を解明するとともに、寝たきりからの復帰を目指す食品、薬品の開発は期待されており、この研究により高齢者の「生活の質」を改善して、健康寿命を延ばすことが可能となる。

2. 研究の目的

私たちは、ラットをボールマンケージに簡易拘束した寝たきり動物モデルを初めて開発した。この寝たきりラットモデルにおいて、寝たきり状態のヒトで起こる高コレステロール血症や脂質代謝異常、肝障害が起こることを見いだした。

本研究では、このモデルがヒトのモデルとして適切であるかどうかを検討することを大きな目的とする。そして、寝たきり状態で起こる脂質代謝異常や肝機能の悪化を遺伝

子レベルで解析して、寝たきり動物モデルを確立する。ヒトでは外部に現れる表面的な兆候しか検討できなかったため、動物モデルを用いることで、遺伝子レベルからそのメカニズムを調べることができる。

次に確立された動物モデルを用いて、寝たきりからの復帰促進食品の開発も目標とする。これまで寝たきりのヒトの栄養学は全くされておらず、寝たきりからの復帰促進食品という概念すらなかった。本研究では、寝たきりからの復帰促進食品の評価も遺伝子レベルからできるのが特徴である。そして、高齢者の「生活の質」の改善を目指して、寝たきりからの復帰を促進する医薬品の開発につながる可能性も期待される。

3. 研究の方法

★寝たきり動物モデルの確立

①寝たきり動物モデルを用いて、脂質代謝異常が起きるメカニズムの遺伝子レベルでの解析。

ウィスター系雄ラットをボールマンケージに入れる群と通常のワイヤーケージに入れる群に分けた。ワイヤーケージ群を対照群とする。このラットに高コレステロール食を与え、6週間飼育した。最終日に4時間絶食後深夜0時に屠殺し血清を得た。動物から肝臓、脂肪組織を採取した。血清脂質と血清 ALT、AST 活性を市販のキットを用いて測定した。採取した臓器からの全 RNA を抽出し、その RNA をマイクロアレー解析とリアルタイム PCR 解析に用いた。

1. アフィメトリクス社のマイクロアレー解析（多検体解析: n=3）を行う

アフィメトリクス社のジーンチップ(ラット全ゲノム)に全 RNA の cDNA をハイブリダイズさせてその蛍光強度を読み取った。

2. バイオインフォマティクス解析により、脂質代謝のメカニズムを解明する。

R を用いて正規化を起こった。MAS 法、RMA 法、DFW 法を行い、クラスター解析、主因子解析により MAS 法を選択した。正規化されたデータからランキング法を用いてトップ 1000 の遺伝子を抽出した。ランキング法として WAD 法、RP 法を用いて、リアルタイム PCR 法の結果と照らし合わせて、WAD 法を選択した。抽出された 1000 の遺伝

子を IPA というバイオインフォマティクス・ソフトウェアに投げることで、ファンクション解析、パスウェイ解析、ネットワーク解析を行った。

マイクロアレー解析により変化の大きかった遺伝子や代謝上重要だと思われる遺伝子を選び、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現を検討した。アプライドバイオシステム社のステップワンを用いて、アプライド社の試薬の指示に従い測定を行った。

3. チロキサポールの投与により VLDL 異化を阻害して、血液中に蓄積するコレステロールと中性脂質から、肝臓から放出される VLDL の速度を測定した。

ウィスター系雄ラットをワイヤーケージとボールマンケージに入れて、6 週間飼育した。最終日に 4 時間絶食後 13 時に頸静脈から生理食塩水で希釈したチロキサポールを注射し 2 時間、4 時間、6 時間後に採血して、血中コレステロールと中性脂質の濃度を測り、その増加率から肝臓からの VLDL コレステロール、VLDL 中性脂質の放出速度を算出した。

②寝たきり動物モデルを用いて、肝障害が起きるメカニズムの遺伝子レベルでの解析。

①と同様に肝臓 RNA を抽出し、マイクロアレーならびにバイオインフォマティクス解析を行い、肝障害が起きるメカニズムを検討した。

★寝たきり状態からの復帰を促進する食品成分の探索

③寝たきり動物モデルに様々なタンパク質・アミノ酸を摂取させ脂質代謝、肝機能を評価した。

ウィスター系雄ラットをボールマンケージ入れる群と通常のワイヤーケージに入れる群に分けた。ワイヤーケージ群を対照群とする。それぞれの群をさらに 3 群に分け、計 6 群に分けた。タンパク質源としてカゼイン、大豆タンパク質、卵白タンパク質を用いて、高コレステロール食とした実験食を 6 週間与えた。最終日に 4 時間絶食後深夜 0 時に屠殺し血清を得た。動物から肝臓、脂肪組織を採取した。血清脂質と血清 ALT、AST 活性を市販のキットを用いて測定した。採取した臓器からの全 RNA を抽出し、その RNA をリアルタイム PCR 解析に用いた。

4. 研究成果

寝たきり群では、血清コレステロール濃度が増加し、血清 ALT、AST 活性が増加した。血清コレステロール濃度の増加は肝臓からの VLDL コレステロール、VLDL 中性脂質の放出速度の増加によることがわかった。

肝臓の RNA を抽出してマイクロアレー解析

を行い定量化した。定量化データを MAS 法により正規化し、WAD 法によるランキングを行い、IPA によるバイオインフォマティクス解析を行った。ファンクション解析から、寝たきり状態により脂質代謝、糖質代謝、アミノ酸代謝の遺伝子発現変動が見られた。また、寝たきり状態は、細胞増殖や細胞周期、細胞死に関する遺伝子群の変動も見いだされた。細胞死のカテゴリーをさらに詳しく解析したところ、細胞死の他にアポトーシス、肝細胞死のサブカテゴリーに変動があることがわかった。

コレステロール代謝では大きな変化は見られなかったが、リアルタイム PCR 解析から中心的転写因子である LXR mRNA 量が低下することがわかった。一方、含硫アミノ酸代謝の変動により、胆汁酸代謝が変動したため、血中コレステロールが増加した可能性が考えられた。システインからタウリンへの転換が抑制されているため胆汁酸のタウリン抱合が減少し、グリシン抱合胆汁酸に対する比が減少すると考えられる。この比率は血中コレステロール濃度に重要であることが示されており、これが血中コレステロール濃度を増加させた可能性がある。

中性脂質に関して、リアルタイム PCR 解析から SREBP1 mRNA 量が顕著に低下することがわかった。

バイオインフォマティクス解析により明らかになった細胞増殖やアポトーシスに関する遺伝子を解析するためネットワーク解析を行ったところ、p53 を中心とするネットワークが描け、寝たきりモデルラットの肝臓において p53 が変動することにより肝細胞が死んでいる可能性が考えられた。さらに細胞増殖を抑制する p21 を中心としたネットワークも描けることがわかり、p21 を介する増殖抑制と p53 を介するアポトーシスが寝たきり状態の動物の肝臓で起きている可能性が推測された。実際に、リアルタイム PCR 法によって、サイクリン D1 の減少や、p21 の増加が観察され、細胞増殖は抑制されていることが示唆された。これらの肝細胞の増殖抑制とアポトーシスの増加が、寝たきり状態における血中肝障害マーカーの増加に結びついた可能性が考えられた。

食餌タンパク質の影響を見た実験においても、カゼインをタンパク質源として用いた群において寝たきり状態によって高コレステロール血症と血中肝障害マーカーの増加が観察された。卵白タンパク質は、これまで私たちの研究から血中コレステロール濃度を低下させることが知られていたが、寝たきり状態によって引き起こされる高コレステロール血症も抑えることがわかった。しかし、肝障害を抑制することはなかった。一方、大豆タンパク質も血中コレステロール濃度を

低下させることが知られているタンパク質であるが、寝たきり状態によって引き起こされる高コレステロール血症を抑制することがわかった。大豆タンパク質は、寝たきり状態で起きる肝障害も完全に抑えることが明らかとなった。食餌タンパク質は、寝たきり状態で起きる脂質代謝異常や肝障害を変動させる機能があることが初めて明らかとなった。

これらの結果は、食餌性因子によって寝たきり状態で起きる代謝異常や細胞障害を抑え、寝たきりからの復帰を促進できる可能性を強く示唆するものである。

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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

1) ローラン・トマ、市川礼奈、何墨耕、小田裕昭：寝たきりモデル動物における脂質代謝異常・肝障害メカニズムのバイオインフォマティクス解析 第65回日本栄養・食糧学会大会 2011年5月 東京

2) 小田裕昭：「寝たきり状態」それ自身によって起きる肝障害・脂質代謝異常とアミノ酸代謝の変動 日本外科代謝栄養学会第48回学術集会 2011年7月 名古屋

3) 小田裕昭：寝たきり状態によって引き起こされる代謝異常 シンポジウム「食スタイルの分子生物学—不活動症候群(寝たきり)、シフト・ワーカーは何をどのように食べたらよいか」日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月 仙台

[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

小田裕昭 (Hiroaki Oda)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20204208