

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750038

研究課題名(和文) 食後の血管炎症とmiRNA発現変動に着目した食品の新たな動脈硬化予防機構の検討

研究課題名(英文) Regulation of postprandial vascular inflammation by food components: potential roles of miRNA-mRNA networks

研究代表者

岸本 良美 (KISHIMOTO, Yoshimi)

お茶の水女子大学・お茶大アカデミック・プロダクション・寄附研究部門准教授

研究者番号：70600477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではmiRNAによるmRNA制御に着目し、食後におけるこれらの発現変動解析から、血管炎症に対して予防的に働く食品因子を明らかにすることを目的とした。飽和脂肪酸であるパルミチン酸やグルコースの刺激により、血管内皮細胞における炎症や細胞死が惹起されること、ポリフェノールなどの食品因子の中にはそれらを抑制する作用を有するものがあることが明らかとなった。また、ヒトが脂肪を摂取した際にも、末梢血単核球において炎症などに関連するmRNA発現が増加する可能性が示された。それらをターゲットとするmiRNAを検索した結果、血管炎症の制御に関与しうるmiRNA-mRNAの調節機構が存在する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to address if postprandial vascular inflammation is regulated by miRNA-mRNA networks and to evaluate the effects of various food components on the regulatory system. In the cultured cell-based assay, we found that the endothelial inflammation and the cell death were evoked after palmitic acid or glucose exposure, while some functional food factors (e.g. polyphenols) could attenuate the inflammatory responses. The up-regulations of mRNA expression of inflammation-related genes were observed in the isolated peripheral blood mononuclear cells after intake of the fatty meal in the human study. miRNA-mRNA networks might have a impact on the regulation of postprandial vascular inflammation.

研究分野：食生活学、食品機能学、分子栄養学

キーワード：動脈硬化 血管炎症 miRNA

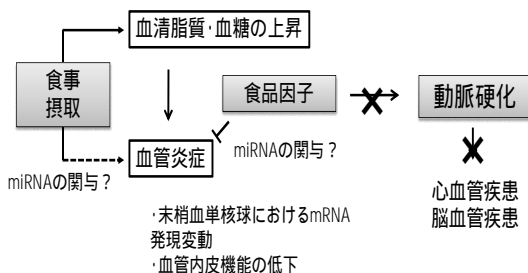
1. 研究開始当初の背景

脂質や糖質の過剰な摂取は、長期的な影響として肥満をはじめとする代謝異常を引き起こすだけでなく、一過的にも酸化ストレスの増大や炎症反応を惹起することで、動脈硬化進展のリスクとなる可能性が指摘されている。急激な血清脂質の上昇によって炎症マーカーの一つであるC反応タンパク質(CRP)の増加や血管内皮機能障害が起こることや、血糖の急激な増減(グルコース・スパイク)は持続的な高血糖よりも血管炎症を惹起すること等が報告されている。このような背景から、脂質や糖質と一緒に摂取することで食後の炎症を抑制し、血管機能の改善が期待できる食品因子を明らかにすることは動脈硬化予防に極めて重要である。

また、近年 micro RNA (miRNA) と呼ばれる non-coding RNA が転写後遺伝子制御に関わることが明らかとなってきた。miRNA は組織特異的に発現され、発現異常により様々な疾患に関与しており、癌や冠動脈疾患患者の血液中では、miRNA の発現プロファイルが健康者と異なることから、新たな疾患マーカーとして、さらには治療ターゲットとしての応用が進められている。動脈硬化の観点からは、脂質代謝やインスリン抵抗性などに対する影響を中心に、動物実験や培養細胞を用いた詳細な検討が進められ、miRNA が代謝異常に関与する分子機構も徐々に明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究では、近年新たに解明された生体調節機構である miRNA による mRNA 制御に着目し、食後におけるこれらの発現変動解析から、血管炎症に対して予防的に働く食品因子を明らかにすることを目的とし、培養細胞を用いた検討と、ヒトにおける脂肪摂取試験を行った。



3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞に対するパルミチン酸、グルコース刺激の影響

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) にパルミチン酸、グルコース刺激を行い、濃度ならびに時間をふり、細胞生存率、活性酸素種産生、炎症性サイトカインや接着分子等の mRNA 発現、miRNA 発現を PCR やマイクロアレイにて検討した。得られた効果について

パスウェイ解析を行い、どのような経路に影響があったのか、また miRNA と mRNA の変動パターンにどのような関連があったのかを検討した。

(2) 脂肪摂取後の末梢血単核球における mRNA、miRNA 発現変動の検討

健康成人男性に脂肪食(パン、バター)を摂取させ、摂取3時間後に採血を行い、血清ならびにフィコール溶液を用いて末梢血単核球(PBMNCs)を分取した。血清脂質濃度、炎症マーカーの測定ならびに、末梢血単核球における mRNA、miRNA 発現量を PCR やマイクロアレイにて検討した。さらにパスウェイ解析を行い、mRNA、miRNA 発現解析の結果と既知の臨床指標をあわせて、どのような代謝経路に影響があったのかを検討した。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞に対するパルミチン酸、グルコース刺激の影響

パルミチン酸

パルミチン酸刺激により、濃度ならびに時間依存的に細胞生存率が低下した。遺伝子発現量の解析において、炎症性サイトカインである interleukin 6 (IL-6)、IL-8、接着分子 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)、また cyclooxygenase-2 (COX-2)などの mRNA 発現が増加した。これらの変動に対して、抑制作用を有するポリフェノールを見出した。興味深いことに、パルミチン酸刺激により、抗酸化酵素である heme oxygenase 1 (HO-1)が顕著に増加し、ポリフェノールによりさらなる増加が見られた。作用メカニズムについて検討した結果、パルミチン酸によるこれらの遺伝子発現変動には MAP キナーゼや NF-κB、AP-1、Nrf2 などの転写因子が関与している可能性が示された。

一方、これらの mRNA 発現調節作用を有する miRNA について、文献ならびにデータベースで検索し、miR-126、-155、-320a について発現を検討したが、有意な変化は見られなかった。そこで、マイクロアレイによる網羅的解析を行ったところ、パルミチン酸刺激により多くの mRNA ならびに miRNA の変動が見られ、PCR においても確認を取ることができた。

	mRNA	miRNA
2倍以上に増加した遺伝子数	537	102
0.5倍以下に減少した遺伝子数	572	113

マイクロアレイ解析の結果から、3種類の miRNA に着目し、リアルタイム PCR により発現変動を確認したところ、そのうちの2種類の miRNA に有意な発現上昇が認められた。そこで、この2種類の miRNA がターゲットとする mRNA の中で、マイクロアレイにおいて顕著な発現減少が見られていた数種類をピックアップし、リアルタイム PCR で発現変

動を確認した。その結果、いくつかの遺伝子において有意な発現減少が認められ、miRNAによる mRNA 制御機構が働いている可能性が示された。さらに、ポリフェノールによる血管内皮炎症改善作用について、種々の阻害剤の添加や siRNA によるノックダウンなどを試み、作用機序の検討を行った。

培地中へ分泌される miRNA についても検討を試みたが、回収量や発現量が少なく、影響を検討することはできなかった。

グルコース

グルコース刺激においては、炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 接着分子 ICAM-1, COX-2 の mRNA 発現量の増加が見られ、それらを抑制するポリフェノールを見出した。

(2) 脂肪摂取後の末梢血単核球における mRNA、miRNA 発現変動の検討

脂肪摂取後に、血清トリグリセリド(TG)、カイロミクロン-TG、レムナント様リポタンパク質コレステロール(RLP-C)、アポリポタンパク質 B48 濃度の有意な上昇が見られた。

末梢血単核球より RNA を抽出し、遺伝子発現量の変動を検討した。その結果、炎症や脂質代謝に関連する遺伝子(PPAR α , CD36 など)の発現増加傾向が認められた。さらにこれらの mRNA 発現調節作用を有する miRNA について、文献ならびにデータベースで検索した。

脂肪摂取後の末梢血単核球における遺伝子発現量の変動をマイクロアレイ解析において検討したところ、2 倍以上に増加した mRNA は 11 個あり、"response to stress"などに関連する遺伝子が発現変動していた。また、2 倍以上に増加した miRNA は 20 個、0.5 倍以下に減少していた miRNA は 7 個あった。

(3) 総括

本研究より、飽和脂肪酸であるパルミチン酸やグルコースの刺激により、血管内皮細胞における炎症や細胞死が惹起されること、ポリフェノールの中にはそれらを抑制する作用を有するものがあることが明らかとなった。また、ヒトが脂肪を摂取した際にも、末梢血単核球において炎症性サイトカインの mRNA 発現が増加する可能性が示された。さらにそれらをターゲットにしうる miRNA を検索した結果、血管炎症の制御に関与しうる miRNA-mRNA の調節機構が存在する可能性を見出した。

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)

Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K: Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin. *Marine Drugs*, 14: 35, 2016

DOI: 10.3390/md14020035

査読あり

岸本良美: 動脈硬化予防におけるポリフェノールの可能性: 日本未病システム学会誌: 21: 130-133: 2015

査読なし

〔学会発表〕(計 8 件)

岸本良美: 脂肪摂取後の生体応答から動脈硬化予防を考える: 日本油化学会第 53 回年会: 2014 年 9 月 10 日: ロイトン札幌(北海道札幌市)

招待講演

岸本良美: 動脈硬化予防におけるポリフェノールの可能性: 第 21 回日本未病システム学会学術総会: 2014 年 11 月 1-2 日: 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

招待講演

Kishimoto Y, Suzuki-Sugihara N, Saita E, Taguchi C, Kondo K: Gene expressions of HO-1 and inflammatory factors in HUVECs are drastically induced by palmitic acid and diversely modulated by polyphenols: 12th Asian Congress of Nutrition: 2015 年 5 月 14-18 日: パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Kishimoto Y, Kamijo F, Saita E, Suzuki-Sugihara N, Kitadate K, Taguchi C, Kondo K: Effects of Oligonol on high glucose-induced inflammatory responses in endothelial cells: 23rd International Congress on Nutrition and Integrative Medicine: 2015 年 7 月 25-26 日: ロイトン札幌(北海道札幌市)

岸本良美, 鈴木(杉原)規恵, 才田恵美, 田口千恵, 近藤和雄: 飽和脂肪酸刺激下における血管内皮細胞の適応とポリフェノールの影響: 第 19 回日本適応医学会学術集会: 2015 年 9 月 12-13 日: 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)

岸本良美, 鈴木(杉原)規恵, 才田恵美, 田口千恵, 谷真理子, 近藤和雄: 飽和脂肪酸刺激による血管内皮炎症に対するクルクミンの抑制作用: 第 70 回日本栄養・食糧学会大会: 2016 年 5 月 13-15 日: 武庫川女子大学(兵庫県西宮市)

Kishimoto Y, Fujisawa T, Saita E, Suzuki-Sugihara N, Kitadate K, Taguchi C, Kondo K: Effects of Oligonol on high glucose-induced inflammatory responses in THP-1 macrophages: 24th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine: 2016 年 7 月 9-10 日: ロイトン札幌(北海道札幌市)

岸本良美: ポリフェノールの摂取状況と機能性に関する最近の知見: 第 23 回日本未病システム学会学術総会: 2016 年 11 月 5-6 日: 九州大学(福岡県福岡市)
招待講演

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 良美 (KISHIMOTO, Yoshimi)
お茶の水女子大学・お茶大アカデミック・ブ
ロダクション・寄附研究部門准教授
研究者番号：70600477