

分子疫学および iPS 細胞を用いた抗酸化食品成分の 評価系の構築

【助成対象者】

山梨大学大学院 大学院医学工学総合研究部
准教授 望月 和樹

【共同研究者】

山梨大学 大学院医学工学総合研究部
黒澤 尋

山梨大学 大学院医学工学総合研究部
山下 さやか

【研究の目的】

2 型糖尿病や、心疾患などの大血管障害などの代謝性疾患は、健康時からの積極的な予防が重要である。特に、これらの代謝性疾患の発症進展の根源には酸化傷害があると考えられている。それゆえ、抗酸化食品成分の摂取が、これら代謝性疾患の発症進展を抑制するかを調べる目的で、多くの動物実験が行われている。しかしながら、動物実験では、貴重な生命が犠牲にされるだけでなく、その研究成果も、必ずしもヒトの発症機構を反映したものあるとは限らない。そこで、本研究では、抗酸化食品成分摂取による代謝性疾患の発症進展の抑制機構を、分子疫学およびヒト iPS 細胞およびヒト骨格筋幹細胞を用いた動物実験代替法によって明らかにすることを目的とした。

【研究の成果】

<分子疫学による動物実験代替法>

I 市における 2005 年度基本健康診査受診者のうち、明らかな代謝性疾患のない 40-64 歳(平均値 \pm SD、53.1 \pm 7.0) の女性 894 名および 40-69 歳(平均 \pm SD、58.7 \pm 7.8) の男性 413 名を対象とした。簡易型自記式食事歴法質問票 (BDHQ) を用いた過去 1 か月間の食事摂取により栄養素および食品の摂取量を算出した。血液中の炎症性サイトカイン[IL-1 β (女性、男性) および IL-6 (男性)]濃度を測定した。栄養素・食品摂取量と、血液中炎症性サイトカイン濃度および血液臨床検査パラメータとの関連を検討した。

1. 健康女性における血中 IL-1 β 濃度と食事摂取との関連

摂取エネルギーおよび年齢でマッチングし、対象者を IL-1 β 濃度低値群 (N=145)、中値群 (N=145)、高値群 (N=145)に分け、臨床検査値および食品・栄養素の摂取との関連を調べた。その結果、血中 IL-1 β 濃度が低い対象者は、血糖値、BMI、 γ -GTP 活性が低い傾向にあることが明らかとなった。さらに、糖質の摂取量が多く、糖質・果物・お茶の摂取量が多い傾向にあることが明らかとなった。

2. 健康女性における血中 γ -GTP 活性と食事摂取との関連

摂取エネルギーおよび年齢でマッチングし、対象者を γ -GTP 濃度低値群 (N=154)、中値群 (N=154)、高値群 (N=154) に分け、臨床検査値および食品・栄養素の摂取との関連を調べた。血中 γ -GTP 活性が低い対象者は、血糖値、BMI、中性脂肪濃度が低く、カロテン、ビタミン C、淡色野菜、茸類、糖質の摂取量が多い傾向にあることが明らかとなった。

3. 健康女性におけるお茶の摂取量と血液臨床検査パラメータとの関連

摂取エネルギーおよび年齢でマッチングし、対象者をお茶の摂取量低値群 (N=117)、中値群 (N=117)、高値群 (N=117) に分け、臨床検査値および食品・栄養素の摂取との関連を調べた。お茶を多く摂取している対象者は、中性脂肪濃度が顕著に低く、炎症マーカー (γ -GTP と IL-1 β) 濃度も低い傾向にあることが明らかとなった。

4. 健康男性における血中 γ -GTP 活性と食事摂取との関連

対象者を γ -GTP 活性低値群 (N=139)、中値群 (N=141)、高値群 (N=133) に分け、臨床検査値および食品・栄養素の摂取との関連を調べた。血中 γ -GTP 活性が低い対象者は、IL-1 β および IL-6 濃度が低く、カロテン、ビタミン E の摂取量が多い傾向にあることが明らかとなった。

<ヒト iPS 細胞による動物実験代替法>

本研究の開始前において、ヒト iPS 細胞を神経堤細胞に分化させた後に、脂肪細胞へ分化誘導する系の作製に成功している。これまでの研究によって神経堤細胞から分化する脂肪細胞は、白色脂肪細胞であることが報告されていることから、上記の脂肪細胞は、白色脂肪細胞であると考えられた。本研究では、神経堤細胞を経ない方法を用い、褐色脂肪細胞への分化誘導を試みた。

ヒト iPS 細胞は理研 B R C より分譲された 201B7 株を用いた。ヒト iPS 細胞の胚様体形成培養を行い、その 2 日目から 5 日目の 3 日間は 100nM のレチノイン酸を加えた。11 日間の胚様体形成培養の後に、胚様体を接着培養に移し、脂肪細胞分化培地 (インスリン、IBMX、デキサメタゾン、ピオグリタゾン含有) によって 9 日培養した。その結果、細胞内に顕著な脂肪の蓄積が観察される分化細胞が得られた。この分化細胞には脂肪の分化に重要である転写因子 (C/EBP β 、PPAR γ 1、PPAR δ) および脂肪蓄積関連遺伝子 (FAS、ACCP、DGAT2、ACSL1) などの発現が認められたため、脂肪細胞であると仮同定した。これらの脂肪細胞に炎症およびインスリン抵抗性を惹起するサイトカイン TNF- α を投与すると、脂肪蓄積関連遺伝子の発現が顕著に増大したが、TNF- α を投与する前に β カロテンを添加した培地で二日間培養したところ、脂質蓄積関連遺伝子の発現上昇が観察されなかった。今回のヒト iPS 脂肪細胞は、脂肪蓄積能が低いこと、炎症の増大によって脂肪蓄積関連遺伝子の発現が増大することを考えると、褐色脂肪細胞に近い形質を持ち合わせていたと考えられる。それゆえ、 β カロテンの投与は、褐色脂肪細胞に過剰な脂質の蓄積を抑制する作用があることが考えられた。

<ヒト骨格筋幹細胞による動物実験代替法>

ヒト骨格筋 Hu/E18 幹細胞から、脂肪細胞への分化を試みた。ヒト骨格筋幹細胞に、脂肪細胞の分化培地 (インスリン、IBMX、デキサメタゾン、ピオグリタゾン含有) によって 19 日培養した。その結果、細胞内に顕著な脂肪の蓄積が観察された。さらに、脂肪の分化に重要である転写因子

(PPAR γ 1、PPAR γ 2) および脂肪蓄積関連遺伝子 (LPL、aP2) などの遺伝子発現が観察された。また褐色脂肪細胞の分化に重要な転写因子 MYF5、PGC1 α の発現増大が観察された。しかしながら、褐色脂肪細胞の機能に重要な熱産生遺伝子 UCP-1 の発現は観察されず、一方で、白色脂肪細胞の機能に重要なアディポネクチン遺伝子の発現が観察された。

【今後の課題】

<分子疫学による動物実験代替法>

本研究では、主に、2005年度の地域行政の健康診査による横断研究において、炎症の蓄積を示すマーカー（炎症性サイトカインや γ -GTP）との食事摂取との関連を検討した。その結果、炎症マーカーの血中濃度が低い対象者は、糖質の摂取量が多く、果物・お茶の摂取量が多い傾向にあることが明らかとなった。

本研究の問題点は、横断研究のためその因果関係に言及することができないところにある。本研究では、対象者の5年後の臨床パラメータ・生活習慣のデータを倫理委員会の承諾のもと採取している。よって、今後、本研究の対象者の追跡調査を行うことによって、その因果関係を明らかにするつもりである。さらに、介入試験などを実施することによって野菜の摂取、お茶の摂取などが、酸化傷害の抑制に有効であるかを明らかにしていく必要があると考えられる。

<ヒト iPS 細胞による動物実験代替法>

本研究では、ヒト iPS 細胞から脂肪細胞様細胞への分化系の構築に成功した。前年度に白色脂肪様細胞と考えられる系の作製に成功している。それゆえ、ヒト iPS 細胞より、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞ともにその作製に成功したことになる。今後、作製した脂肪細胞の形質をより詳しく調べる必要があると考えられる。本研究で作製した褐色脂肪様細胞は、顕著な脂肪の蓄積が観察されたものの、PPAR γ 2 などの脂肪の分化に重要である転写因子の発現が低かったために、分化系の最適化をさらにを行い、より生体内の褐色脂肪細胞を反映する系を構築する必要がある。さらに、本研究では、炎症性サイトカイン TNF- α を投与すると脂肪の蓄積関連遺伝子の発現が増大すること、 β カロテンの投与が TNF- α によって誘導される脂肪の蓄積関連遺伝子の発現上昇を抑制することを発見した。この結果は、 β カロテンの投与が、TNF- α によって誘導される褐色脂肪細胞の機能低下を抑制したことを示している。今後、他の抗酸化食品成分（カテキン、ビタミン E、ビタミン C、野菜・果実中のフラボノイドなど）の作用も検討する必要があると考えられる。さらに、白色脂肪様細胞の分化系の最適化および抗酸化食品成分の作用を明らかにしていく必要がある。

<ヒト骨格筋幹細胞による動物実験代替法>

本研究では、ヒト骨格筋 Hu/E18 幹細胞に脂肪分化の刺激を与えたところ、顕著な脂肪の蓄積および白色脂肪細胞様（アディポネクチンなど）の遺伝子発現および褐色脂肪細胞の分化に必要な転写因子（MYF5 など）を検出した。これらの結果は、骨格筋内の脂肪細胞は、褐色脂肪細胞および白色脂肪細胞の作用をとともにもつ細胞である可能性を示唆している。しかしながら、分化系の最適化が不十分である可能性もある。よって、本細胞が、ヒト骨格筋内の異所性脂肪と同等の遺伝子発現をしているかどうかを調べるとともに、抗酸化食品成分の作用を検討する必要があると考えられる。

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

本研究で得られた成果を随時、学術集会および欧文論文として発表していく予定である。