



秋山 晴代¹、長部 隆広²、根来 孝治²、荒木 真由美³、瀬戸山 央³、青木 信義³、渡邊 裕子¹、
甲斐 茂美¹、中野 泰子²、宮澤 眞紀¹



¹神奈川衛研, ²昭和大・薬, ³神奈川産技セ

目的

未病とは健康と病気の間で連続的に変化している状態であり、生活習慣病をはじめとする病気を予防するためには、この時期の診断(未病診断)を行うためのターゲット因子探索が非常に重要となる。本研究では、未病を「生体内で小規模な炎症が起こりつつある状態」と定義し、易炎症性を示すアディポネクチン(Adn)アンチセンストランスジェニック(AsTg)マウス¹⁻³)を用いて各種臓器のアミノ酸量や遺伝子発現量の変化などを解析し未病の指標となるかを検討した。

方法

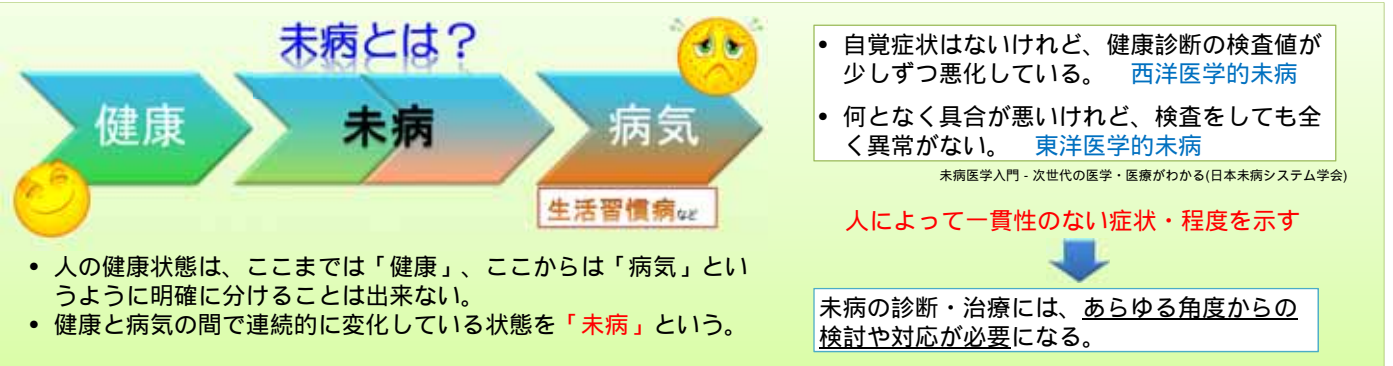
15週齢のAdn AsTg及び野生型マウスのオス・メスより血漿、脂肪組織を採取した。臓器及び血漿中のアミノ酸濃度をAgilent 1290 Infinity LCおよびAB SCIEX API 4000 LC-MS/MSシステムにより測定した⁴⁻⁶)。各種臓器よりRNAを調製後 Agilent Single Color及びGeneSpringソフトウェアを用いてマイクロアレイ解析を行った。また、Bio-Plexを用いて血漿中各種サイトカイン/ケモカイン量を測定した。

結果

Adn AsTgマウスのメスでは野生型に比べほとんどの脂肪中アミノ酸濃度が有意に上昇していた(Fig.2)。マイクロアレイ解析によりAdn AsTgマウスでは、オス・メスとも炎症に関与する遺伝子発現量が脂肪組織で上昇していた(Table1-2)。血漿中アミノ酸測定をしたところ、Adn AsTgマウスのメスでロイシン及びグルタミン濃度が、オスでトリプトファン濃度が顕著に上昇した(Fig.4)。各種血漿中サイトカイン濃度を測定したところ、オスではIL-1 及びIL-2濃度が有意に低下し、メスではPAI-1濃度が上昇した(Fig.5)。

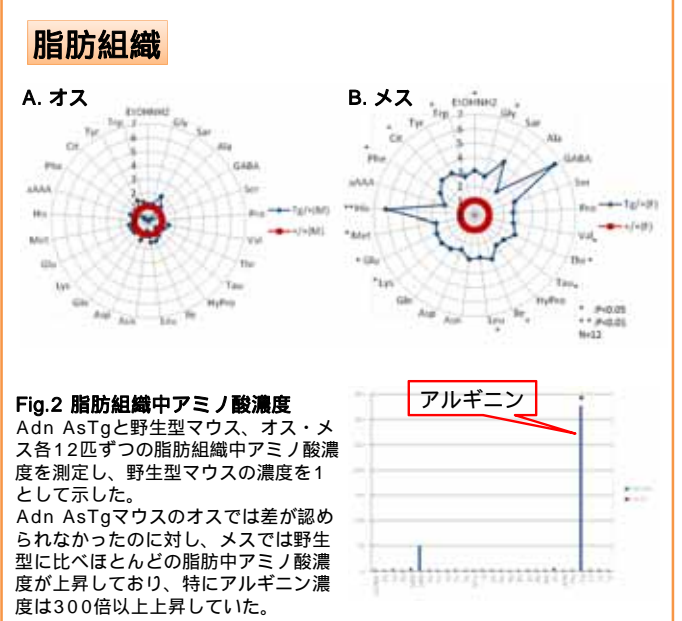
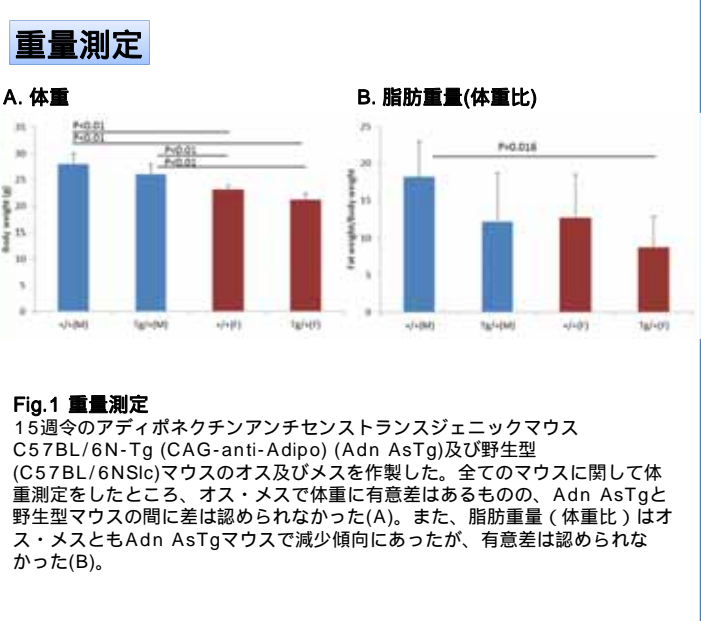
考察

Adn AsTgマウスは表現型に異常が見られないにもかかわらず、脂肪組織で炎症を誘発・持続しやすい状態にあることがマイクロアレイの結果で判明した。また、野生型と比べAdn AsTgマウスでは、一部の血漿中アミノ酸やサイトカイン濃度に顕著な違いが認められ、さらにこれらの因子とアディポネクチン濃度の相関を解析したところ、全く異なる相関性を示した。以上のことから、血漿中アミノ酸やアディポネクチンなどのサイトカイン濃度を測定し詳細に解析することで、未病診断の指標となる可能性が示唆された。



アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌される長寿ホルモンで、**抗炎症作用、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用**など多くの機能を持つ。

アディポネクチンアンチセンストランスジェニックマウス
野生型マウスと比較して
・組織の**アディポネクチン量がわずかに少ない** → 肥満や糖尿病患者と同様
・**炎症が起こりやすい**にもかかわらず、表現型に変化なし
→ 検査値に異常が見られない未病と同様



脂肪組織

Table 1. 脂肪組織の各種遺伝子発現量 (オス)

| 検定 | 野生型との比較 | 大きな変動が見られた遺伝子 | 働き |
|--------------|---------------------------|----------------------------|---|
| t検定 (p<0.01) | 上昇 587既知遺伝子 (total927) | Fucosyltransferase-9 (約5倍) | ・フコース転移酵素のひとつで、クローン病や病原性微生物感染などの疾患関連遺伝子 |
| | | BMP3(約5.2倍) | ・脂肪細胞分化亢進に関与 |
| | 低下 38既知遺伝子 (total57) | Dbp(約1.6倍) | ・PPAR γ (脂肪細胞分化に関与する転写因子)の発現を促進 |
| | | cadherin4(約2倍) | ・Adnにより活性化 |

脂肪組織中の各種遺伝子発現量をマイクロアレイで解析したところ、有意に発現が上昇した遺伝子の中で最も発現量の変動が大きかったのは、Fucosyltransferase9だった。対して、発現が低下した遺伝子の中で最も発現量の変動が大きかったのは、脂肪細胞分化亢進に關するBone morphogenetic protein3(BMP3)であり、このほかD site albumin promoter binding protein(Dbp)の発現量が低下しており、これらの相乗作用により脂肪細胞の分化が抑制されている可能性があり、Adn AsTgマウスの脂肪重量(体重比)の低下傾向に、これら因子が関与している可能性が示唆された。他に、Adnにより活性化されるcadherin4(Cdh4)の発現量が抑制されていることから、代謝が阻害されていることが示唆された。

Table 2. 脂肪組織の各種遺伝子発現量 (メス)

| 検定 | 野生型との比較 | 大きな変動が見られた遺伝子 | 働き |
|--------------|---------------------------|--|---------------|
| t検定 (p<0.01) | 上昇 112既知遺伝子 (total137) | Insulin-like growth factor binding protein3(約4倍) | ・1型糖尿病のヒトで上昇 |
| | | MMP11(約2倍) | ・炎症性刺激で活性化される |
| | 低下 104既知遺伝子 (total132) | Neuronatin(約8倍) | ・インスリン分泌に関与 |

野生型と比べAdn AsTgマウスで発現が上昇した遺伝子のうち、特にInsulin-like growth factor binding protein3で4倍程度の上昇が認められた。さらに、炎症性刺激で活性化されるmatrix metalloproteinase 11の発現も2倍程度上昇していた。一方、アディポネクチンとよく似た構造を持ち、炎症抑制能を示すC1q and tumor necrosis factor related protein3も顕著に増加していることから(2倍程度)、Adn AsTgマウスでは複雑に脂肪代謝を調節しており、これらのシグナルバランスが保たれることで、表現型に異常が見られないものと示唆された。

以上のことから、オス・メスとも、Adn AsTgマウスでは脂肪組織で炎症を誘発・持続しやすい状態であることが分かった。

なお、ここには示していないが、骨格筋組織でも同様にマイクロアレイ解析を実施しており(オス・メス)、炎症を誘発しやすい状態であることを確認している。

血漿

A. 総アディポネクチン濃度 B. 高分子アディポネクチン比

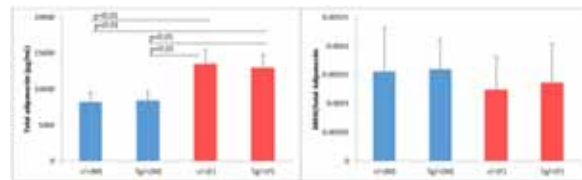


Fig.3 血漿中アディポネクチン濃度測定

総アディポネクチン濃度を測定したところ、オスに比べメスで有意に上昇していたが、Adn AsTgと野生型マウスの間に違いは認められなかった(A)。また、高分子量アディポネクチン/総アディポネクチン比を測定したが、大きな変化は認められなかった(B)。

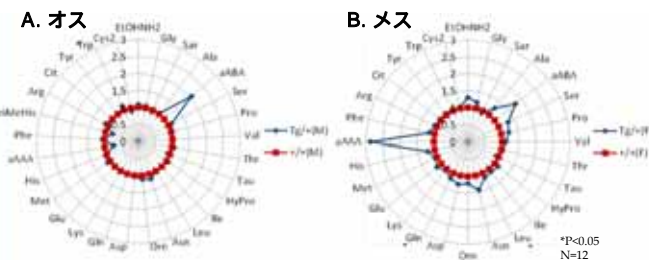


Fig.4 血漿中アミノ酸濃度測定

オスのAdn AsTgマウスは血漿中トリプトファン濃度に上昇が認められた(A)。またメスでは、ロイシン及びグルタミン濃度が野生型に比べ有意に上昇していた(B)。

Table 3. 血漿中アディポネクチン濃度と各種アミノ酸濃度の相関

| 検定 | オス | | メス | |
|--|-----------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|
| | 野生型 | Adn AsTg | 野生型 | Adn AsTg |
| Pearsonの相関係数 | 総アディポネクチン | 総アディポネクチン | 高分子量アディポネクチン | 高分子量アディポネクチン |
| | 正相関するアミノ酸8種 | 正相関するアミノ酸5種 | 負相関するアミノ酸3種 | 正相関するアミノ酸4種 |
| アラニン、セリン、アスパラギン酸、オルニチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、フェニルアラニン | アラニン、セリン、アスパラギン酸、オルニチン、チロニン | プロリン、バリン、イソロイシン、オルニチン、チロニン | グリシン、オルニチン、フェニルアラニン | スレオニン、ハイドロキシプロリン、リシン、メチオニン |

血漿中アディポネクチン濃度と各種アミノ酸濃度の相関を解析したところ、マウス種ごとに相関を示すアミノ酸が異なっていた。血中アディポネクチン濃度とアミノ酸濃度を詳細に解析することで、炎症が起こりやすい状態を把握出来る可能性が示唆された。

A. オス B. メス

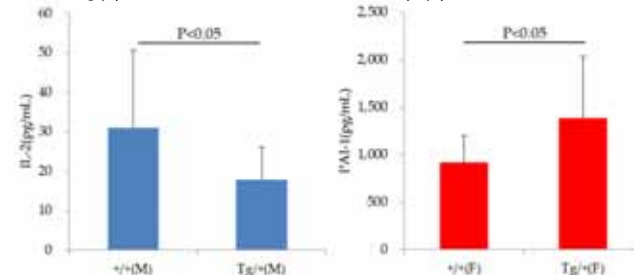


Fig.5 血漿中各種サイトカイン濃度測定

Bio-Plexを用いて下記31種類のサイトカイン類の血漿中濃度を測定した(IL-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-, KC, MCP-1, MIP-1, MIP-1, RANTES, TNF-, Ghrelin, GIP, GLP-1, Glucagon, Insulin, Leptin, PAI-1, Resistin)。その結果、オスAdn AsTgマウスではIL-2が有意に低下していた。また、メスに関しては種々の炎症性疾患で上昇すると報告のあるPAI-1の有意な上昇が認められた。

Table 4. 血漿中アディポネクチン濃度と各種サイトカイン濃度の相関

| 検定 | オス | | メス | |
|--------------|-----|--|-----|--|
| | 野生型 | Adn AsTg | 野生型 | Adn AsTg |
| Pearsonの相関係数 | なし | 高分子量アディポネクチン 負相関するサイトカイン1種 Insulin | なし | 総アディポネクチン 正相関するサイトカイン9種 IL-2, IL-4, IL-5, IL-12p70, IL-17, Eotaxin, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β |

血漿中アディポネクチン濃度と各種サイトカイン濃度の相関を解析したところ、野生型では全く相関が認められないのに対し、Adn AsTgマウスでは相関を示すサイトカインがあることが分かった。このことから、アディポネクチンと各種サイトカインの相関を見ることで、炎症が起こりやすい状態かどうかを判断できる可能性が示唆された。

まとめ

血漿中アディポネクチンのほか、アミノ酸やサイトカイン濃度を測定し、詳細に解析することで、未病診断の指標となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1)Nesoro T, Kim M, Takuma A, Saito K, Shimizu S, Nakano Y. *Mol Immunol.* 257(2), 141-150 (2014).
- 2)Saito K, Arata S, Hosono T, Sano Y, Takahashi K, Choi-Miura NH, Nakano Y, Tobe T, Tomita M. *Biochim Biophys Acta.* 1761(7), 709-716 (2006)
- 3)Nakano Y, Tajima S, Yoshimi A, Akiyama H, Tsuchida M, Tanioka T, Negoro T, Tomita M, Tobe T. *J Lipid Res.* 47(7), 1572-1582(2006)
- 4)Shimbo K, Kubo S, Harada Y, Oonuki T, Yokokura T, Yoshida H, Amai M, Nakamura M, Kageyama N, Yamazaki J. *Biomol Chromatogr.* 24, 683-691(2009)
- 5)Shimbo K, Oonuki T, Yahashi A, Hirayama K, Miyano H. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 23, 1483-1492 (2009)
- 6)Shimbo K, Yahashi A, Hirayama K, Nakazawa M, Miyano H. *Anal Chem.* 81, 5172-5179 (2009)

助成金

平成26-27年度神奈川県未病研究事業 (政策局科学技術・大学連携課)

「未病に關与するターゲット因子解明とその応用」