

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01701

研究課題名(和文)生活習慣病におけるmicroRNAのバイオマーカーとしての意義に関する研究

研究課題名(英文) Study on the significance of microRNAs as a biomarker in lifestyle-related diseases

研究代表者

鈴木 浩明 (Suzuki, Hiroaki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40344890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病における血中microRNA (miRNA) のバイオマーカーとしての意義について検討した。玄米と白米によるランダム化比較試験における血清サンプルを用いて血中miRNAの変化を検討し、複数の血中miRNAが玄米群で白米群と異なった変化をした。玄米群では、白米群に比べて有意に体重が変化した。血中miRNAの動きから、玄米の体重減少効果は、褐色脂肪細胞の活性化とは異なった機序で起こることが示唆された。また、インスリン抵抗性や血清脂質値の変化と関連するmiRNAも認められた。

研究成果の概要(英文)：We examined the significance of circulating microRNAs (miRNAs) as a biomarker in lifestyle-related diseases. Changes in circulating miRNAs were examined using serum samples of participants enrolled in a randomized controlled trial comparing the effects of brown rice consumption and white rice consumption on body weight and serum glucose and lipids levels. Multiple circulating miRNAs were changed differently between the brown rice group and white rice group. In the brown rice group, the body weight was significantly decreased compared with the white rice group. The changes of circulating miRNAs suggested that brown adipocytes activation is not a cause of the weight loss effect of brown rice consumption. We also identified a miRNA which affects insulin resistance and serum lipid levels.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：microRNA バイオマーカー 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

Micro RNA(miRNA)は細胞内に存在する長さ20~25塩基の noncoding RNA の一種で、他の遺伝子の機能を制御する働きを有する。現在、ヒトゲノム上に2000種類以上のmiRNAが見いだされている。miRNAはその標的メッセンジャーRNA(mRNA)の3'UTRを認識して標的mRNAを不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク産生を抑制する。miRNAは標的遺伝子発現を微調整 fine tuning することにより、発生や細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、代謝など広範に影響を及ぼしている。いくつかのmiRNAが代謝や血管機能にも影響を与えていることが知られている。また、miRNAは血中にも存在することが知られている。血中のmiRNAが細胞の遺伝子発現制御を行うかどうかは不明であるが、少なくとも、いくつかの病態では血中miRNAが増加もしくは減少することが知られており、疾患のバイオマーカーとして期待されている。

これまでのmiRNA研究は、少数の機能の知られているmiRNAの関与を調べるか、miRNAアレイを利用しても、その数は100前後と少なかった。しかし、最新のアレイでは、2000以上ものmiRNAの発現が一括で解析できるようになってきており、これまで知られていなかったようなmiRNAが疾患と関連していることが明らかとなる可能性は高い。また、マウスとヒトでmiRNAのターゲットに若干相違が認められるものもあり、動物だけでなくヒトでの検討は重要である。

糖尿病やメタボリックシンドローム、一部の癌は生活習慣病と分類され、遺伝因子に加えて、過食や偏った食事、運動不足、ストレス、喫煙などの“悪い”生活習慣の蓄積によって発症する疾患である。Steno-2試験では、2型糖尿病患者を対象に、これらのリスクを包括的に管理することで、大血管症や微小血管症の発症リスクを各々半減させることを示した。しかし、包括的管理を厳格に行ってもなお、イベントを発症する患者が少なからず存在することも示している。これには、介入時にすでに合併症が進行しているために介入効果が十分に得られない患者や、未知の危険因子の存在、リスク管理の達成状況、遺伝的要因など個人差があるためと考えられる。したがって、合併症発症をより抑制するためには、これらの合併症の存在や治療効果の予測ができるようなバイオマーカーを見いだすことも重要である。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、血中miRNAの生活習慣病のバイオマーカーとしての意義について検討することである。血中miRNAの変化が疾患の早期診断や病態および作用機序の解明に役立つ可能性がある。

3. 研究の方法

表面加工玄米の体重減少効果について検討したランダム化比較試験に参加した被験者の血清を採取し、miRNeasy Serum/Plasma kit (QIAGEN社)でmiRNAを抽出した。

このランダム化比較試験は、40歳から64歳の過体重かつ前糖尿病状態の被験者36名を表面加工玄米群(玄米群)と白米群にランダムに割り付け、12週間の介入を行い、試験終了時の体重変化量を主要評価項目、腹囲および糖脂質代謝を副次的評価項目とした。玄米群、白米群とも18名であり、平均年齢は、各々、 55 ± 7 歳と 52 ± 7 歳($p = 0.282$)と有意差は認めなかった。12週の介入により、体重は、玄米群 -2.4 ± 2.0 kg、白米群で -0.2 ± 1.1 kgと有意に玄米群で体重が減少した($p < 0.001$)。また、腹囲の変化量も玄米群 -3.1 ± 2.9 cm、白米群 -0.4 ± 1.3 cmと玄米群で有意に減少した($p < 0.01$)。また、血清トリグリセリド値、LDL-C値、small dense LDL値も玄米群で有意に減少した(すべて $P < 0.01$)。

玄米群、白米群とも介入前(0週)および介入終了時(12週)に採取した各々10名分の血清をプールし抽出したmiRNAから逆転写酵素によりcDNAを作成し、EXIQON社のmiRNAパネル(miRCURY LNA miRNA Focus PCR Panels Serum-Plasma)およびAgilent Human miRNAマイクロアレイにより血清miRNA発現解析を行った。発現に変化が見られたmiRNAのうち、玄米群と白米群で異なった変化が認められたmiRNAについて、生物学的重要性と血中の発現量から2種類のmiRNAを選び、36名分の個々の血清miRNAを抽出し、定量的RT-PCRで標的miRNAの発現を定量化した。定量的RT-PCRは、EXIQON社のRT-PCRキットとLNAプライマー、ABI7300を用いて行った。血清リポタンパク分画はHPLC法(LipoSEARCH、スカイライト・バイオテック社)で測定した。

定量化したmiRNAと、体重、腹囲、糖脂質代謝マーカーとの関連についてSpearmanの順位相関係数で解析した。定量的RT-PCRによる発現変化は、hsa-miR-423を参照としたCt法で解析した。2群の差は、対応のないt-検定で検定した。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) プール血清による発現解析

玄米群および白米群両者で0週と12週で発現に変化が認められたmiRNAの数を図1に示す。定量的RT-PCRで介入により増加が認められたmiRNAは玄米群(A)で27、白米群で15あり、両者ともに増加したのは3種類であった。一方、介入により減少したmiRNAは玄米群で23、白米群で14であり、両者ともに減少したのは5種類であった。一方、マイクロアレイによる発現解析では、介入により増加が認められたmiRNAは玄米群66、白米群1であり、両者で共通に増加したものはなかつ

た。また、介入により減少が認められた miRNA は、玄米群 133、白米群 161 あり、共通に減少したのは 51 種類存在した。

玄米および白米の継続的摂取により、多くの血清 miRNA が変動することがあきらかとなった。しかも、玄米群および白米群で共通して変動する miRNA は少ないことも明らかとなった。また、定量的 RT-PCR によるパネルとマイクロアレイでは、miRNA の検出方法が異なるため、定量的 RT-PCR パネルで変化が認められた miRNA とマイクロアレイで変化の認められた miRNA の種類に重なりはほとんど認められなかった。解析できる miRNA の種類という点ではマイクロアレイが有利であるが、定量性と感度という点では定量的 RT-PCR の方が有利である。今後、発現の少ない miRNA を測定するという点では、次世代シーケンサーによる miRNA シークエンスを行い、種類と発現量を評価することも検討すべき課題と考えられた。

(2) 個別血清による発現解析

玄米は様々なポリフェノールを含み、一部は褐色脂肪組織を活性化する可能性があり、褐色脂肪細胞が活性化すると減少する miRNA である hsa-miR-92a-3p を候補とした(1)。また、hsa-29a-3p は肝臓での脂肪合成に関与することが報告されている。他、玄米群と白米群で発現に差が大きかった hsa-miR-1、hsa-miR-155-5p、let-7b-3p についても定量的 RT-PCR を行ったが、これらの miRNA は血中での発現量が低く、多くの検体で検出感度を下回ったため、それ以上の解析は行わなかった。

hsa-miR-29a-3p および hsa-miR-92a-3p の変化を表 1 に示す。玄米群および白米群における hsa-miR-29a-3p の Ct 値は、各々、0 週 2.7 ± 0.9 、 2.7 ± 1.0 ($p = 0.868$)、12 週 2.4 ± 1.6 、 2.5 ± 1.1 ($p = 0.785$)、Ct -0.4 ± 2.0 、 -0.2 ± 1.5 ($p = 0.682$) と、介入によって両群の miRNA の発現に有意差は認めなかった。一方、hsa-miR-92a-3p については、玄米群、白米群の Ct 値は、各々、0 週 -3.9 ± 0.9 、 -3.7 ± 1.1 ($p = 0.688$)、12 週 -4.0 ± 0.9 、 -3.0 ± 0.8 ($p = 0.001$)、Ct は -0.1 ± 1.4 、 0.8 ± 1.2 ($p = 0.052$) と玄米群で血清 hsa-miR-92a-3p が増加するという結果が得られた。

体重、腹囲、収縮期血圧、拡張期血圧、総コレステロール値、トリグリセリド値、LDL-C 値、HDL-C 値、空腹時血糖値、空腹時インスリン値、インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR)、AST、ALT、GTP、尿素窒素、クレアチニン、尿酸値、リポタンパク分画と hsa-miR-29a-3p の Ct との相関を検討した。hsa-miR-29a-3p の Ct と有意な相関が認められたのは、血清インスリンの変化量 ($Rho = -0.351$, $p = 0.045$)、HOMA-IR の変化量 ($Rho = -0.424$, $p = 0.014$)、LDL-C 値の変化量 ($Rho = -0.505$, $p = 0.002$)、VLDL 粒子数の変化量

($Rho = -0.364$, $p = 0.034$)、総 LDL 粒子数の変化量 ($Rho = -0.414$, $p = 0.015$)、中間サイズ LDL 粒子数の変化量 ($Rho = -0.477$, $p = 0.004$) であった。一方、0 週と 12 週の hsa-miR-29a-3p の Ct と上記解析項目とは有意な相関は認めなかった。

hsa-miR-92a-3p については、0 週と 12 週の Ct および Ct と体重および腹囲を含む解析項目と有意な変化は認められなかった。褐色脂肪細胞の活性化マーカーである miR-92a-3p は、褐色脂肪細胞が活性化すると血清の発現量は低下する。Ct および Ct は低値の方が発現が大きいので、玄米群の体重と腹囲の減少効果が褐色脂肪細胞による可能性は低いと考えられた。玄米群で hsa-miR-92a-3p の発現が増加したのは、体重減少に対して基礎代謝を落とすという適応減少を見ている可能性が考えられた。玄米に含まれるポリフェノールにより褐色脂肪細胞活性化が起こっている可能性は否定できないが、体重減少による褐色脂肪細胞の活性低下の方がより影響が強いと考えられる。

miR-29a の抑制がマウスの肝臓における脂質合成酵素群の発現を抑制し、sirtuin 1 (Sirt1) の発現を増加させることや(2)、2 型糖尿病患者の骨格筋において miR-29a の発現が亢進しており、持続的運動によってその発現が低下すること、マウス骨格筋における miR-29a の過剰発現がインスリンシグナル伝達系の遺伝子群を低下させてインスリン抵抗性を増加させることが報告されている(3)。今回の検討でも、hsa-miR-29a-3p の発現の増加 (Ct の低下) とインスリン抵抗性の悪化、血清 LDL-C 値の上昇に関連が認められた。また、HPLC によるリポタンパク分画解析では、hsa-miR-29a-3p の増加と VLDL 分画の増加、中間サイズ LDL 分画の増加が有意に相関しており、hsa-miR-29a 発現増加が肝臓での脂肪合成亢進と VLDL 合成・分泌亢進を介して血清アポ B 含有リポタンパク (VLDL および LDL) の発現を調節している可能性が示唆された。HOMA-IR は、グルコースクランプ法と相関が高いとされているが、空腹時血糖と IRI の積で求められるため、肝臓でのインスリン抵抗性とも関連している。今回の HOMA-IR と hsa-miR-29a-3p の相関が、肝臓と骨格筋のどちらのインスリン抵抗性の変化と強く関連しているかは不明である。今後、肝臓での miR-29a の変化とインスリン抵抗性との関連についても検討が必要と考える。

(3) まとめ

以上のことから、血清 miRNA は食品の機能性とその機序を推定する上で有用なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。今後、研究期間中に解析できなかった miRNA、特に機能が未知な miRNA について解析を加えていく必要がある。

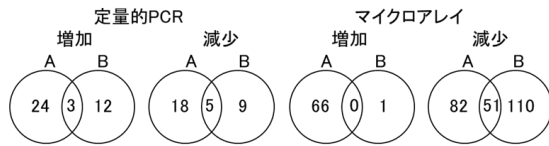


図 1. miRNA パネル (定量的 PCR) と Agilent Human miRNA マイクロアレイ (マイクロアレイ) による血清 miRNA の発現解析。A が玄米群、B が白米群。

表 1. 玄米群および白米群における血中 miR-29a-3p と miR-92a-3p の Δ Ct 値と $\Delta\Delta$ Ct 値

	玄米群	白米群	P 値	
N	18	18		
年齢 (歳)	55±7	52±7	0.282	
体重の変化量 (kg)	-2.4±2.0	-0.2±1.1	0.000	
腹囲の変化量 (cm)	-3.1±2.9	-0.4±1.4	0.002	
miR-29a-3p	Δ Ct 0 週	2.7±0.9	2.7±1.0	0.868
	Δ Ct 12 週	2.4±1.6	2.5±1.1	0.785
	$\Delta\Delta$ Ct	-0.4±2.0	-0.2±1.5	0.682
miR-92a-3p	Δ Ct 0 週	-3.9±0.9	-3.7±1.1	0.688
	Δ Ct 12 週	-4.0±0.9	-3.0±0.8	0.001
	$\Delta\Delta$ Ct	-0.1±1.4	0.8±1.2	0.052

データは平均±SD

<引用文献>

Chen Y, et al. Exosomal microRNA miR-92a concentration in serum reflects human brown fat activity. *Nature Commun* 7:11420, 2016

Kurtz CL, et al. Inhibition of miR-29 has a significant lipid-lowering benefit through suppression of lipogenic programs in liver. *Sci Rep* 5:12911, 2015

Massart J, et al. Altered miR-29 Expression in Type 2 Diabetes Influences Glucose and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle. *Diabetes* 66:1807-18, 2017

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 5 件)

Shoko Furukawa, Hiroaki Suzuki, Kazuya Fujihara, Kazuto Kobayashi, Hitoshi Iwasaki, Yoko Sugano, Shigeru Yatoh, Motohiro Sekiya, Naoya Yahagi, Hitoshi Shimano. Malondialdehyde-modified LDL-related variables are associated with diabetic kidney disease in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. in press 査読有 DOI:https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.05.019

Yoichi Tachi, Yuri Sakamoto, Akiko Koike, Kayoko Sasaki-Fukatsu, Kaoruko Iida, Tetsuro Kita and Pao-Li Wang, The

Effect of Habitual Exercise on the Height of Female University Students, *International Journal of Fitness, Health, Physical Education & Iron Games*, 5 : 1-8, 2018 査読有

Yoichi Tachi, Yuri Sakamoto, Akiko Koike, Kayoko Sasaki-Fukatsu, Kaoruko Iida, Tetsuro Kita, Pao-Li Wang, Impact of Exercise and Nutrition on Bone Mass, *Journal of Hard Tissue Biology*, 26, 381-385, 2017 査読有 DOI:https://doi.org/10.2485/jhtb.26.381

Risa Araki, Reiko Ushio, Keiko Fujie, Yukari Ueyama, Hiroaki Suzuki, Yoshio Nakata, Koichi Hashimoto. Effect of partially-abraded brown rice consumption on body weight and the indicators of glucose and lipid metabolism in pre-diabetic adults: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition ESPEN* 19:9-15, 2017 査読有 DOI:https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.015

荒木理沙、松浦文奈、藤江敬子、中田由夫、鈴木浩明、橋本幸一。表面加工玄米の食べやすさに関する探索的ランダム化クロスオーバー試験。日本栄養・食糧学会誌。69:249-255, 2015 査読有

DOI:https://doi.org/10.4327/jsnfs.69.249

[学会発表](計 10 件)

荒木理沙、潮玲子、藤江敬子、植山ゆかり、鈴木浩明、中田由夫、橋本幸一。表面加工玄米の継続摂取による脂質代謝改善効果の検討：リポタンパク質粒子サイズ解析に基づく血中脂質プロファイル。日本農芸化学会 2017 年度大会。2017 年植山ゆかり、荒木理沙、藤江敬子、忌部尚、宮脇正博、鈴木浩明、中田由夫、谷本啓爾、佐野寛行、寺前純吾、花房俊昭、橋本幸一。表面加工玄米の継続摂取による体重減少効果。つくば医工連携フォーラム 2017。2017 年

荒木理沙、藤江敬子、中田由夫、鈴木浩明、松井幸一、植松勝太郎、柴崎博行、安藤貴彦、植山ゆかり、磯田博子、橋本幸一。オリーブ葉茶の継続飲用によるヒトの健康増進効果に関する探索的検討。第 11 回ポリフェノール学会年次大会。2017 年

助川宏子、桑原隆明、深津(佐々木)佳世子, 生活習慣病(糖尿病性血管障害、がん)における玄米食の有効性について ~ G A B A の見地から ~。第 54 回日本食生活学会。2017 年

助川宏子、深津(佐々木)佳世子。食事療法としての玄米菜食(マクロビオ

ティック食)の有効性の検討, 第21回日本統合医療学会(招待講演), 2017年

荒木理沙、潮玲子、藤江敬子、植山ゆかり、鈴木浩明、中田由夫、橋本幸一。表面加工玄米の継続摂取による減量効果ランダム化比較試験。第37回肥満学会。2016年

鈴木浩明、古川祥子、藤原和哉、岩崎仁、小林和人、矢藤繁、関谷元博、矢作直也、伊坂正明、野牛宏晃、島野仁。2型糖尿病におけるMDA-LDLと腎症との関連。第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会。2016年

古川祥子、鈴木浩明、藤原和哉、岩崎仁、小林和人、矢藤繁、矢作直也、野牛宏晃、島野仁。MDA-LDLと糖尿病細小血管障害との関連。第59回日本糖尿病学会年次学術集会。2016年

鈴木浩明、古川祥子、岩崎仁、小林和人、矢藤繁、矢作直也、野牛宏晃、島野仁。糖尿病性腎症と心血管疾患に関する検討。第59回日本糖尿病学会年次学術集会。2016年

Hiroaki Suzuki, Shoko Furukawa, Kazuya Fujihara, Kazuto Kobayashi, Hitoshi Iwasaki, Shigeru Yato, Motohiro Sekiya, Naoya Yahagi, Hiroaki Yagy, Hitoshi Shimano. Serum malondialdehyde- modified LDL levels are increased in type 2 diabetic patients with nephropathy. European Association for the Study of Diabetes 2016 Annual Meeting, 2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 浩明 (SUZUKI, Hiroaki)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 40344890

(2) 研究分担者

岩崎 仁 (IWASAKI, Hitoshi)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 20626874

深津 佳世子 (FUKATSU, Kayoko)
共立女子大学・家政学部・教授

研究者番号: 70338903

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし