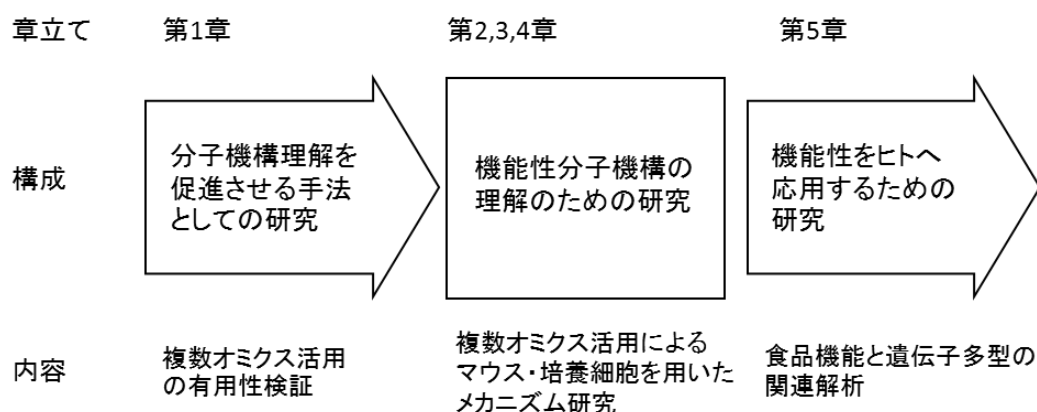


論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 24 年度博士課程進学
氏名 高橋祥子
指導教員名 加藤久典

【論文題目】多層的オミクスを活用したクロロゲン酸の抗糖尿病・抗肥満作用の研究

多くの疫学研究によりコーヒーの継続的摂取による 2 型糖尿病の予防効果が証明されているもののその関与成分や作用機序については未解明なところが多く、今後の課題として注目されている。本研究では、研究対象生物として培養細胞・マウス・ヒトを用いて、研究アプローチ手法としてはトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス、ゲノミクスを用いるという多面的な切り口から研究を行いその有用性を検証するとともに、コーヒー摂取の効果の分子機序に迫ることを目的とした。第一章ではまず多層的オミクスの有用性を検証し、第二～四章では糖尿病モデルマウスや培養細胞を研究対象に複数のオミクスを活用して分子機構を理解することを目指し、さらに第五章ではヒトへの応用を考えた遺伝子多型との関連性の研究を行った。



第一章 多層的オミクスの実現とその有用性の検証に関する研究

ニュートリゲノミクス研究の概念という切り口から、まずは食餌誘導性肥満モデルマウスを用いて、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスの解析を行い、そのデータを比較・検討することで、複数のオミクスを多層的に取り入れることの有用性を検証することを目的とした。オミクスデータから高脂肪食負荷マウスの肝臓では脂質の酸化・輸送、酸化ストレスの増加や TCA 回路、尿素回路の抑制の方向にさまざまな分子の変動があることが見いだされた中で、複数オミクスの各ステージでの変動の中で一致するような変動も見られたが、多くは各オミクスに固有なデータであった。これは、さまざまな遺伝子毎に分子のセントラルドグマを進むスピードが異なることの裏付けとなるデータである。遺伝子毎に時間軸が異なるため、複数のオミクスを組み合わせることによって初めて生体の応答を立体的に検証していくことが可能となる。ただでさえ膨大なデータをいくつも統合することで、より複雑性

を生み出すように一見思われるが、データの持つ意味、利点、限界を認識した上で多層的なオミクスデータを捉えるのであれば、複数のオミクスを組み合わせるアプローチはニュートリゲノミクス研究にとって極めて有用であることが考えられた。

第二章 糖尿病モデル KK-Ay マウスを用いたコーヒーポリフェノールの生理作用の検証

本章では KK-Ay マウスを用いて 2 つの動物実験を行った。まずはコーヒー摂取による体重増加・脂肪蓄積抑制がコーヒー中のカフェインに由来しないことを実証し、次に、カフェインレスコーヒーと同等量のクロロゲン酸のみを摂取させることで、同様の効果が見られることを実証した。コーヒーを 3 週間摂取させたマウスの脂肪組織、骨格筋、肝臓における遺伝子発現変動を、DNA マイクロアレイを用いて解析した結果、カフェインレスコーヒー摂取により脂肪組織では MCP1 経路、細胞外マトリックス過剰産生や炎症の抑制、骨格筋ではストレス抑制、肝臓ではミトコンドリアの酸化ストレスが緩和されていることが考えられた。これらの各組織で起こっている変化が、コーヒー摂取による体重脂肪重量や血中パラメータの変化に寄与している可能性が示された。しかし、各組織における変動プローブセット数が比較的少なかったことから、これらの発現変化のみからクロロゲン酸の効果を説明することが難しいと考えられ、生体分子の網羅解析を行うには適切なステージではないことも考えられた。この一つの要因として、重度の糖尿病モデルマウスに高脂肪食を負荷した条件では、肥満や高血糖の進行の影響が強く現れ、クロロゲン酸摂取による生体内の影響を捉えることが難しい可能性が考えられた。そこで次に、体重や肝臓中の脂肪蓄積抑制などの表現型が観察された後の分子の変化ではなく、まだ肥満を発症していないマウスを用いて、クロロゲン酸の短期的な摂取がマウスの肝臓に及ぼす変化を捉えることで、クロロゲン酸摂取による生体内の初期応答を詳細に調べることを次章の目的とした。

第三章 クロロゲン酸短期投与によるエネルギー代謝変動作用の検証

本章では、まだ肥満を発症していないマウスを用いることで、クロロゲン酸の短期的な摂取がマウスの肝臓に及ぼす変化を捉えることを目的とした。C57BL/6J マウスを用いた *in vivo* 試験により、クロロゲン酸によるエネルギー代謝変動作用を検討した。その結果、体重に変化が見られない初期段階でも、クロロゲン酸を摂取した群では、活動量に変化がないにも関わらずエネルギー消費量が増大していることが明らかとなった。解剖時の肝臓サンプルを用いてトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析を行った。DNA マイクロアレイ解析の結果、クロロゲン酸摂取によりマウスの肝臓で脂肪酸合成や脂肪肝に関する遺伝子の発現変動が起こっていること、プロテオミクスでは脂質代謝関連タンパク質だけでなく TCA サイクルから電子伝達系の経路や、ATP 合成に関わるタンパク質(ATP5B、ATP5J)の発現増加が明らかとなった。これらのことから、クロロゲン酸を摂取したマウスの肝臓では、アセチル CoA から TCA サイクル、電子伝達系、ATP 合成の経路が活性化することでエネルギー産生が充進し、脂肪酸合成系への経路が抑制されることが考えられた。クロロゲン酸の短期摂取によりエネルギー代謝の変動が認められ、トランスクリプトミクスとプロテオミクスを合わせて行うことで、その背景で起こっている分子の変動を捉えることができ、クロロゲン酸を慢性的に摂取するとこれらの効果が蓄積され、肝臓の脂肪蓄積抑制、抗肥満効果に繋がる可能性が考えられた。

第四章 クロロゲン酸が HepG2 細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響の検討

これまでに得られたコーヒー摂取によってエネルギー代謝が変動するメカニズムの詳細を、培養細胞を用いて解析することを目的とした。ヒト肝がん由来細胞 HepG2 をクロロゲン酸含有培地で培養し、ミトコンドリア活性を MTT アッセイにより測定した結果、添加濃度依存的にミトコンドリア活性を上昇させることが明らかとなった。次に、ミトコンドリアのどの酵素を活性化しているのかを調べるために、各種酵素活性の測定を行った。動物実験で得られた知見を基に、TCA サイクルでの重要な酵素であるクエン酸合成酵素、イソクエン酸脱水素酵素およびリンゴ酸脱水素酵素の酵素活性を測定した。その結果、クロロゲン酸が 3 つ全ての酵素活性を上昇させることが明らかとなった。続いて、上記の培養条件で得た HepG2 細胞からタンパク質を抽出し、iTRAQ を用いたプロテオミクスを行った。変動したタンパク質に対してエンリッチメント解析を行った結果、解糖系酵素やミトコンドリア酵素が変動していることが確認された。これらのタンパク質の発現が上昇していたことから、グルコースから TCA サイクルへの経路が促進していることが考えられた。またミトコンドリアの電子伝達系の酵素であり、電子伝達系から ATP を合成する酵素のタンパク質発現量が増加していたことから、TCA サイクルが活性化されるだけでなく、そこで得られた NADH から電子伝達系、ATP 合成までが促進されていることが考えられた。in vitro 実験で得られた知見から、クロロゲン酸があることによって肝臓の細胞では、TCA サイクルの酵素活性が上昇するだけでなく、解糖系の増進、また TCA サイクルから電子伝達系、ATP 合成に至るまでのミトコンドリア機能を活性化することが示唆された。

第五章 コーヒー摂取と脂肪蓄積に関するヒト遺伝子多型の解析

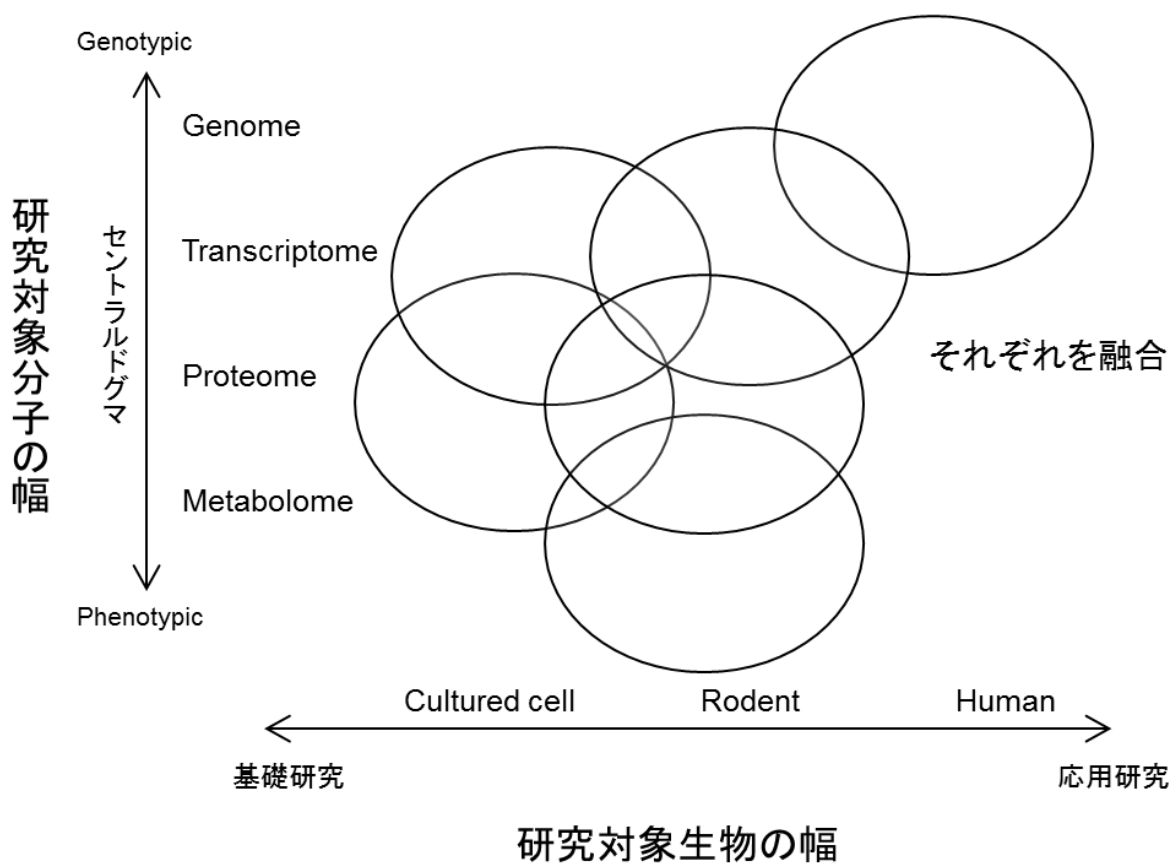
各章で得られたクロロゲン酸摂取の有用効果の知見をヒトに応用することを考えて、健常な日本人の大規模遺伝子データとともに、各個人の生活習慣等に関するデータを活用しながら、コーヒー摂取の有用効果と遺伝子多型の関連を調べることを目的とした。日本国内在住の 18 歳以上男女 1207 人における 3 つの遺伝子多型(rs12149832、rs855791、rs13130484)の情報とアンケートによる中性脂肪、空腹時血糖値、HbA1c 値との関連解析を行った。コーヒー摂取量が 1 日 1 杯未満と 1 日 1 杯以上の 2 群に分け、それぞれの群において中性脂肪値の値を比較すると中性脂肪値が有意に低減していることが明らかとなった。また、ジェノタイプごとにコーヒー摂取と中性脂肪値との関連を調べた結果、FTO 遺伝子の一塩基多型である rs12149832 のジェノタイプが AG あるいは GG の群では、コーヒー摂取と中性脂肪値に明確な差は見られなかったが、AA の群ではコーヒー摂取群で中性脂肪値が有意に低かった。これらのことから、コーヒー摂取による中性脂肪の低減効果はその個人が持つ遺伝子多型によって、その効果に差が見られるということが明らかとなった。日本の健常人においてコーヒー摂取量が中性脂肪の値を下げる作用には遺伝子多型の個人差が存在することが見いだされた。

まとめ

機能性食品には効能が知られていてもその作用機構が不明のままであるものが数多く残されており、食品の健康効果をより深く理解するためには系統的な研究を進めることが重要であると考えられるため、

本研究のように、多面的な対象・視点・手法を用いて健康効果の分子機構解析に取り組む例は重要である。オミクス技術を活用したニュートリゲノミクス研究では、これまで単一のオミクスのみを適用した研究が多かったが、本研究のように多面的・多層的な視点で行う研究によって、より深い、かつより応用可能な知見が得られる。これらの研究成果を基に肥満や糖尿病など代謝疾患の予防戦略としての食生活スタイルを提案することは、世界中の人々の健康の維持・増進、QOLの向上に繋がる可能性があるため、社会的意義も非常に大きいと考えられる。

本研究で提唱する多層的ニュートリゲノミクス研究の概念



Publications

- **Takahashi, S.**, Saito, K., Jia, H. and Kato, H. *PLOS ONE*, 9, e91134 (2014)
- **Takahashi, S.**, Egashira, K., Jia, H., Saito, K., Abe, K. and Kato, H. *J. Funct. Foods*, 6, 157-167 (2014)
- Jia, H., **Takahashi, S.**, Saito, K. and Kato, H. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 291-306 (2013)
- **Takahashi, S.**, Masuda, J., Shimagami, H., Ohta, Y., Kanda, T., Saito, K. and Kato, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 462-467 (2011)
- Kato, H., **Takahashi, S.**, and Saito, K. *J. Trad. Comp. Med.* 1, 25-30 (2011)