



Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム（2007.12）8巻1号:49～52.

平成17年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題 生活習慣病に関する総合的研究—分子遺伝学的病態解析から予防・治療まで—

藤枝憲二（研究班長）

依 頼 稿 (報告)

平成17年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題 生活習慣病に関する総合的研究—分子遺伝学的病態解析から予防・治療まで—

藤 枝 憲 二*

研究成果の概要

1) 生活習慣病である癌の発生メカニズムの解析

研究代表者 小川 勝洋

[研究背景と目的]

今日、癌は日本人の死因の第一位を占め、その原因の多くは生活習慣によるとされている。しかし、発癌の分子メカニズムは未だ不明の点が多く、とりわけ発癌過程の初期変化については明らかになっていない。我々はマウス肝発癌モデルを用いて検討し、低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) が発癌過程の初期から発現亢進していることを見いだした。本研究では発癌過程の進展における HIF-1 α の発現の意義を明らかにすることを目的とした。

[研究方法]

1. マウス肝発癌モデル初期病変について HIF-1 α の発現、HIF-1 α の標的遺伝子である VEGF、Glut-1、Igf2、c-Met の発現、及び HIF-1 α 発現促進因子である活性型 Akt の発現を Western blot 法、免疫染色により検討した。
2. マウス肝癌細胞を用いて EGF、insulin の HIF-1 α 発現亢進に対する影響、及び PI3K 抑制剤処理後の HIF-1 α 発現変化を検討した。
3. HIF-1 α siRNA knockdown 肝癌細胞を用いて in vitro、in vivo での増殖への影響、及び HIF-1 α / Igf-2/ PI3K/ Akt による autocrine loop 形成の可能性を検討した。

[研究成果と考察]

マウス肝発癌過程において HIF-1 α は初期から高発現しており、その転写標的である VEGF、Igf2、Glut-1、c-Met の発現も亢進していた。HIF-1 α の発現は低酸素によるものではなく、PI3K/ Akt 経路の活性化に伴う蛋白翻訳活性化によることが明らかになった。さらにマウス肝癌細胞では HIF-1 α のノックダウンにより増殖能が著しく低下し、アポトーシスが誘導された。これは HIF-1 ノックダウンにより HIF-1 転写標的である Igf2、TGF α の発現の低下によることが明らかになった。

[まとめ]

マウス肝発癌過程では初期から HIF-1 α の発現が亢進しており、発癌の進展に重要な役割を果たしている。したがって、HIF-1 α は肝癌の予防及び治療の有望な分子標的となりうる。

2) 生活習慣病の早期予防のための幼小児期・思春期からの生活習慣の修正による介入教育システムの構築とその効果判定のためのコホート研究体制の構築

研究代表者 吉田 貴彦
菊池健次郎

[研究背景と目的]

小児の肥満の増加、年少者において既に生活習慣病の発症につながる血液検査の所見を持つケースが指摘されている。そこで、横断的研究によるベースライン作成を行うとともに、幼小児期からの生活習慣の見直し・修正介入のためのコホート研究体制を立ち上げ、将来的に効果検証を行うことを目的とする。また、本

*旭川医科大学 小児科学講座

研究グループは、動物実験において温熱療法が動脈硬化進展の抑制効果を得ていることから、中高年齢軽度生活習慣病者に対する旭川近郊の温泉を利用した温浴の動脈硬化性生活習慣病の進展抑制・退縮効果について検証する。

[研究方法]

旭川地区において学校医園医部会、旭川市保健所、各学校養護教員等と会合を持ち、若年者の生活習慣の実態および生活習慣病予防につなげるコホート体制の確立を目指す。

旭川医科大学内科外来受診の軽度高血圧患者を対象とし、旭川近郊の温泉を利用し週に2回、一日につき午前、午後の2回、極端に長くない入浴を行わせる。初日と最終日の入浴前後に諸検査を行い効果検証をする。他、昼食に減塩特別食を供し、食事指導、ストレッチ体操、温泉浴の方法や健康増進に役立つ講演を行った。

[研究成果と考察]

1. 生活習慣病の早期予防のためのコホート研究体制の構築

医師会小児科部会、学校医園医部会と会合を持った。出席した学校側から養護教員代表から学童・生徒が嫌がるという理由で腹囲の測定ですら困難との回答を受けた。学校ベースの調査は難しい印象を受けた。また、保健所も健康診断時の幼小児の生活習慣の見直し・修正介入のための講演などに時間を割く協力は難しいようであった。当大学医学科学生生活習慣病リスクファクターの推移を検討した。男子は6年間で体重・BMIが有意に経年増加し、これに伴い血圧値も有意に増加した。特に第3~4学年でのstep upが認められ、この時期における生活習慣の是正が必要と思われた。一方女子では体重・BMIがほぼ横ばいにもかかわらず血圧の上昇がみられ、体格以外の要因の関与が示唆された。

2. 軽度生活習慣病者における温熱療養の効果検証

インフォームドコンセントを得た、男性10名、女性11名、年齢52~77歳(平均69.3歳)を対象とした。5週間、週2回の日帰入浴という限局的介入にもかかわらず、温浴療法により主観的健康感や気分の向上、降圧効果と抗動脈硬化などの医学的指標に改善効果とい

う意義深い結果が得られた。今回の介入は、温浴効果に加えて、食事指導や健康講話、健康体操など参加者の健康への意識付けを行った結果である。現実的な温泉利用は転地療養的要素も大きいと考えられるので、総合的な温浴療法が地域住民の健康保持・増進法として有効とした成果は、今後の予防医学の展開に生かされる資料となると考える。

[まとめ]

若年者の生活習慣の実態把握、幼小児期からの生活習慣の見直し・修正介入を行うコホート研究は、将来を担う若年者の健康の保持・増進に資するところが大きいであるが、子どもの将来を考えるべき大人の意識は必ずしも高くなかった。一方、温浴療法により主観的健康感や気分の向上、降圧効果と抗動脈硬化などに改善効果が確認され、総合的な温浴療法が地域住民の健康保持・増進法として有効であることがわかった。今後、生活習慣病予防の視点から、幼小児の良好な生活習慣の獲得および現時点で軽度生活習慣病を有する中高年齢層への両方の介入によって、旭川地域全体の健康レベルの向上が図られることが確認された。

3) 糖尿病性腎症の成因解明と新規治療法の開発

研究代表者 羽田 勝計

[研究背景と目的]

糖尿病性腎症からの透析導入は年々増え続け、1998年からは透析導入原疾患の第1位となっている。したがって、糖尿病性腎症の発症、進展を抑えることは、糖尿病患者の生命予後、QOLを改善する点、また、医療経済的観点からも重要である。糖尿病性腎症を進展させる因子としてTGF- β の関与がほぼ確実視されており、その作用を抑制する物質が、糖尿病性腎症の治療に利用できる可能性がある。そのような物質のひとつとして、cAMPに注目し、cAMPのヒト腎近位尿細管上皮細胞(RPTEC)に対する作用を検討した。

[研究方法]

RPTEC培養上清をSDS PAGE法で電気泳動し、TGF- β 刺激で増加する蛋白質のバンドをLC/MS法で解析した。また、各種刺激下での細胞培養上清、細胞内および核内蛋白発現をWestern Blot法で、mRNA発現をReal-time PCR法で確認した。核内転写調節機構

の検討にはルシフェラーゼアッセイ法を用いた。

[研究成果と考察]

TGF- β 刺激により RPTEC 培養上清で増加する蛋白のうちのひとつが、糖尿病性腎症の進展に関与する可能性が示唆されている PAI-1 であることが LC/ MS で確認された。Western blot および Real-time PCR でも、TGF- β 刺激により PAI-1 発現が増加することが確認され、cAMP アナログ、dB-cAMP は、この PAI-1 発現を抑制した。他の細胞内 cAMP を上昇させる物質 (Forskolin, IBMX, PGE₂) でも dB-cAMP と同様の効果が得られたが、cGMP アナログ、8-Br-cGMP は PAI-1 発現に影響を与えなかった。つぎに、cAMP の TGF- β 刺激伝達系に対する作用機構を検討した。まず MAP キナーゼ経路において、各種 MAP キナーゼ阻害薬のうち、p38 阻害薬のみが、TGF- β による PAI-1 発現を抑制したが、dB-cAMP は、TGF- β による p38 のリン酸化は抑制しなかった。したがって、MAP キナーゼ経路は cAMP の PAI-1 発現抑制には関与しないと考えられた。つぎに、Smad 経路において、dB-cAMP は TGF- β による Smad2 のリン酸化、核内移行に影響を与えなかったが、Smad Binding Element ルシフェラーゼ活性を抑制した。以上より、cAMP は、Smad の DNA 結合に影響を与えることで、PAI-1 発現を抑制していることが示唆された。

[まとめ]

RPTECにおいて、cAMP は、TGF- β 刺激伝達系のうち Smad 経路を抑制することにより、糖尿病性腎症進展に関与するといわれる PAI-1 発現を抑制すると考えられた。細胞内 cAMP を上昇させる物質が糖尿病性腎症の発症、進展を抑える可能性が示唆され、今後は動物実験等での確認が必要であると考えられる。

4) 転写因子 Foxo1 による摂食調節機構の解明

研究代表者 藤枝 憲二
(総括コーディネーター)

[研究背景と目的]

インスリンは摂食調節に関わる重要な因子で、視床下部弓状核でのインスリン受容体の発現のほか、インスリン脳室内投与により絶食時の弓状核での Agouti 関連蛋白 (Agrp)、ニューロペプチド Y (Npy) の発現

増加が抑制されることや摂食量・体重が減少することなどが報告されている。

一方、Forkhead transcription factor o1 (Foxo1) は、インスリンシグナル伝達経路である IRS2-PI3K 経路の下流に存在する転写因子で、インスリン受容体刺激の後 PI3K 依存性に AKT によりリン酸化され、核内から細胞質への移行によりその転写活性を失うインスリンシグナルの負の調節因子である。

今回、視床下部におけるインスリンの摂食調節作用における Foxo1 の役割について種々の検討を行った。

[研究成果と考察]

正常マウスの視床下部弓状核において *Foxo1* が発現していることを in situ hybridization 法にて確認した上で、視床下部での *Foxo1* mRNA 発現量を Real-time PCR 法にて測定したところ、*Foxo1* ヘテロノックアウト (*Foxo1*^{+/-}) マウス (コロンビア大学 Domenico Accili 博士より供与) では野生型マウスの30%まで減少していた。体重、摂食量について両者の間に有意差は認められなかったが、摂食時の血中レプチン濃度については、*Foxo1*^{+/-} マウスは野生型に比べ57.4%と有意に低値であった。レプチン腹腔内投与にて *Foxo1*^{+/-} マウスでは摂食量、体重が有意に減少したことより、*Foxo1*^{+/-} マウスではレプチン感受性が亢進しており、Foxo1 が視床下部においてレプチン感受性を低下させることが示唆された。

さらに、視床下部における他の摂食調節因子の発現を調べたところ、野生型マウスでは絶食により摂食促進因子 *Npy*、*Agrp* の発現が増加するのに対し、*Foxo1*^{+/-} マウスではその変化が認められなかった。また、摂食時により摂食抑制因子であるプロオピオメラノコルチン (*Pomc*) の発現が *Foxo1*^{+/-} マウスにおいて有意に増加しており、Foxo1 が絶食時に *Npy*、*Agrp* の発現を亢進させ、摂食時に *Pomc* の発現を抑制する可能性が示唆された。

マウス *Agrp* プロモーター領域にはいくつかのコンセンサス Foxo 結合配列が存在し、プロモーターアッセイにて Foxo1 によりその活性が有意に上昇する領域を確認し、またゲルシフトアッセイにて Foxo1 がその領域に結合することを確認した。

これらの結果より、Foxo1 は *Agrp*、*Npy*、*Pomc* の発現制御に関与しており、特に *Agrp* については視床

下部弓状核における Foxo1 の標的遺伝子であることがわかった。

[まとめ]

Foxo1 は、視床下部における AgRP、Npy、Pomc といった摂食調節因子の発現制御に関与しており、それによりレプチン感受性を調節しているものと推測された。

5) 生活習慣病に罹患しやすい性格特性の解明

研究代表者：高橋 雅治

[研究背景と目的]

心理学では、欲望を制御することを、セルフ・コントロール（以下 SC と略記）と呼ぶ。たとえば、御馳走を前にして食欲を抑さえることは、その一例である。一般に、SC 傾向が低い人は、生活習慣の維持や改善が苦手であると考えられる。そこで、SC 傾向の測定に適した心理検査を選定し、それらの検査をⅡ型糖尿病患者に適用する研究を行った。これにより、生活習慣病に罹患しやすい性格特性の解明が期待された。

[研究方法]

(1) SC の測定に適した心理検査の選定

時間割引法（目先の報酬を選ぶ傾向）、LOC 尺度（人生を自分で制御できると思う程度）、認知的熟慮尺度（よく考える傾向）、時間的展望体験尺度（長期的目標を持って生きる傾向）、刺激追求尺度（危険を追求する傾向）、調整修正型 SC 尺度（習慣を変える力等）、QOL（生活に満足している程度）を、数百名の大学生に実施した。先行研究から、薬物中毒者は時間割引法で衝動性を示すこと等が示されていた。従って、時間割引法との相関分析により、SC 測定に適した検査が明らかになることが期待された。

(2) SC 検査のⅡ型糖尿病患者への適用

(1)の研究により選定された検査を、健常者群（N=

27）とⅡ型糖尿病の入院患者群（N=19）に適用する症例対照研究、及び、SC 傾向の異なる入院患者の退院後の経過を分析する小規模なコホート研究を行った。この研究は倫理委員会の承認を得て、内科学病態代謝内科分野のスタッフ（羽田勝計・伊藤博史・安孫子亜津子）と共同で行った。

[研究成果と考察]

(1) SC 傾向の測定に適した心理検査の選定

時間割引法で SC 傾向が低いと判定された人は、時間的展望尺度が低く、調整修正型 SC 尺度が低く、かつ、QOL 尺度が低いことが示され、これらの検査が SC の検査に適していることが示唆された。

(2) SC 検査のⅡ型糖尿病患者への適用

健常者と入院患者の比較から、患者群は長期的目標を持って生きる傾向が低く、外部刺激に制御される傾向が高く、QOL が低いことが示された。また、退院 6 ヶ月後の HbA1c の測定値を指標として、SC 検査が退院後の経過を予測できるかどうかを調べるコホート研究を、比較的症状の重い 8 名の患者を対象として行った。その結果、時間的展望体験尺度と HbA1c 値の間に -0.740 ($p<0.05$) という負の相関が見られた。

以上の結果から、時間的展望体験尺度、調整修正型 SC 尺度、及び、QOL 尺度が SC 検査に適していること、及び、それらの検査により退院後の経過を予測できるかもしれないことが示唆された。だが、現時点ではコホート研究の患者数が 8 名であるために、一般的な結論を得ることはできなかった。

[まとめ]

SC 検査を選定する研究、及び、それらをⅡ型糖尿病に適用する研究を行った。その結果、選定された心理検査は退院後の経過を予測するかもしれないことが示された。