

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05958

研究課題名（和文）ウシ筋肉内脂肪蓄積制御における免疫応答ダイナミクスの重要性

研究課題名（英文）Effects of immunological dynamics on bovine intramuscular adipogenesis

研究代表者

山田 知哉（Yamada, Tomoya）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：80343987

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫細胞浸潤による脂肪組織炎症及び脂肪組織老化が、肥育牛の筋肉内脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。黒毛和種肥育牛の脂肪組織老化を検討した結果、内臓脂肪組織の組織老化は皮下脂肪組織より亢進していることが示された。また、ホルスタイン種と比較し、黒毛和種肥育牛では内臓脂肪組織への免疫細胞浸潤および脂肪組織老化が亢進していることが明らかとなった。さらに、筋肉内脂肪蓄積量の多い黒毛和種肥育牛は、内臓脂肪割合が低いことを見出した。以上の結果から、ウシ筋肉内脂肪蓄積の制御は、内臓脂肪組織における免疫細胞を介した組織炎症及び組織老化が影響している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛肉生産では、ロース部位における筋肉内脂肪組織の蓄積が重要視されており、特に黒毛和種肥育牛は、筋肉内脂肪の蓄積能力が高いことが特徴である。本研究において、内臓脂肪における免疫細胞を介した組織炎症と組織老化が、黒毛和種肥育牛における筋肉内脂肪蓄積を制御する要因あること、さらにウシ品種差における筋肉内脂肪蓄積能力にも、これら内臓脂肪の炎症及び老化状態が影響していることが明らかとなった。本研究において得られた成果は、黒毛和種肥育牛における脂肪交雑向上のための飼養管理技術改善に繋がる新たな知見であり、さらにヒト肥満における異所性脂肪蓄積増加の要因解明にも寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of adipose tissue inflammation and senescence state on bovine intramuscular adipogenesis. We showed that the senescent state of visceral adipose tissue in Japanese black cattle was higher than that of subcutaneous adipose tissue. Our results indicated that that breed differences between Japanese black cattle and Holsteins affect the macrophage infiltration and senescence state in visceral adipose tissue. In addition, we showed that that highly marbled Japanese black cattle have a lower percentage of visceral fat. These results suggest that visceral adipose tissue inflammation and senescent state affect the bovine intramuscular adipogenesis.

研究分野：家畜栄養生理学

キーワード：栄養・飼養 肥育牛 脂肪細胞 筋肉内脂肪組織

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 筋肉組織内部等の、通常は脂肪が蓄積しない部位に蓄積する脂肪組織を、異所性脂肪と総称する。牛肉生産では、異所性脂肪である筋肉内脂肪の蓄積が、脂肪交雑として重要視されている。また重度に肥満の進行したヒトや実験動物でも、異所性脂肪の蓄積が進行している。高エネルギー摂取状態では、まず皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の蓄積が増加するが、さらに肥満が進行する結果、異所性脂肪の蓄積が開始されると考えられている。しかし、異所性脂肪の蓄積を制御する要因に関しては未だ不明である。

(2) ヒトや実験動物において、肥満の進行にともない脂肪組織が炎症状態となることが報告されている。さらにヒトや実験動物において、肥満における脂肪組織炎症状態が、脂肪組織の老化を促進することが示されている。これら肥満状態における脂肪組織の炎症及び老化は、脂肪組織内への免疫細胞の浸潤が増加することによる、免疫応答ダイナミクスによって制御されていることが明らかにされた。これらの結果から、反芻動物における異所性脂肪蓄積制御に、脂肪組織における免疫細胞の活動が影響している可能性が推察されるが、詳細は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、肥育牛脂肪組織における免疫応答ダイナミクスが、脂肪組織炎症や老化に及ぼす影響を明らかにすることによって、筋肉内脂肪の蓄積制御機構を解明することを目的とし、以下の検討を実施した。

(2) 脂肪蓄積部位の違いが、肥育牛の脂肪組織における組織老化に及ぼす影響を、皮下脂肪、内臓脂肪、筋肉内脂肪の脂肪部位別に検討を実施した。

(3) ウシ品種の違いが、肥育牛の脂肪組織における免疫細胞の浸潤および組織老化に及ぼす影響を、皮下脂肪、内臓脂肪、筋肉内脂肪の脂肪部位別に検討した。

(4) 黒毛和種肥育牛の筋肉内脂肪蓄積に、免疫細胞浸潤の影響を受けた皮下脂肪や内臓脂肪の体脂肪蓄積状態が及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 黒毛和種肥育牛の、皮下脂肪、内臓脂肪および筋肉内脂肪組織を用い、細胞老化制御因子 p53 遺伝子発現をリアルタイム PCR 法によって脂肪部位別に検討した。さらに、組織老化を検出する SA- $\beta$ gal 染色を実施し、脂肪組織老化を蓄積部位別に検討した。

(2) 脂肪蓄積能力の異なる黒毛和種及びホルスタイン種肥育牛における皮下脂肪、内臓脂肪および筋肉内脂肪組織の凍結切片を作成し、ウシ品種の違いが脂肪組織への免疫細胞浸潤に及ぼす影響を抗マクロファージ抗体 CD68 による免疫組織染色法によって検討した。さらに、ウシ品種の違いが、細胞老化制御因子発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR 法によって、脂肪組織老化に及ぼす影響を SA- $\beta$ gal 染色によって脂肪蓄積部位別に検討した。

(3) 黒毛和種肥育牛を、筋肉内脂肪蓄積状態の異なる枝肉格付 A3、A4、A5 毎に分類し、筋肉内脂肪細胞のセルラリティーに及ぼす影響を検討した。さらに、筋肉内脂肪蓄積に免疫細胞浸潤の影響を受けた皮下脂肪や内臓脂肪の体脂肪蓄積状態が及ぼす影響を明らかにするため、枝肉格付毎の皮下脂肪および内臓脂肪割合が及ぼす影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 黒毛和種肥育牛において、脂肪組織老化を制御する p53 遺伝子発現量は、皮下脂肪組織や筋肉内脂肪組織と比較し内臓脂肪組織が有意に高い値となった (図 1)。さらに、内臓脂肪では、p53 遺伝子発現量と脂肪細胞サイズに有意な正の相関が認められた。これらの結果から、内臓脂肪および筋肉内脂肪では脂肪細胞の肥大化に伴い p53 発現が増加し、p53 依存性の脂肪細胞老化が誘導されると考えられた。さらに、SA- $\beta$ gal 染色の結果から、内臓脂肪組織は皮下脂肪組織より脂肪組織の老化が進行していることが明らかとなった (図 2)。

以上の結果から、脂肪蓄積部位の違いは脂肪組織老化に影響し、皮下脂肪組織と比較し内臓脂肪組織において肥満に伴う脂肪組織老化が亢進していると考えられた。

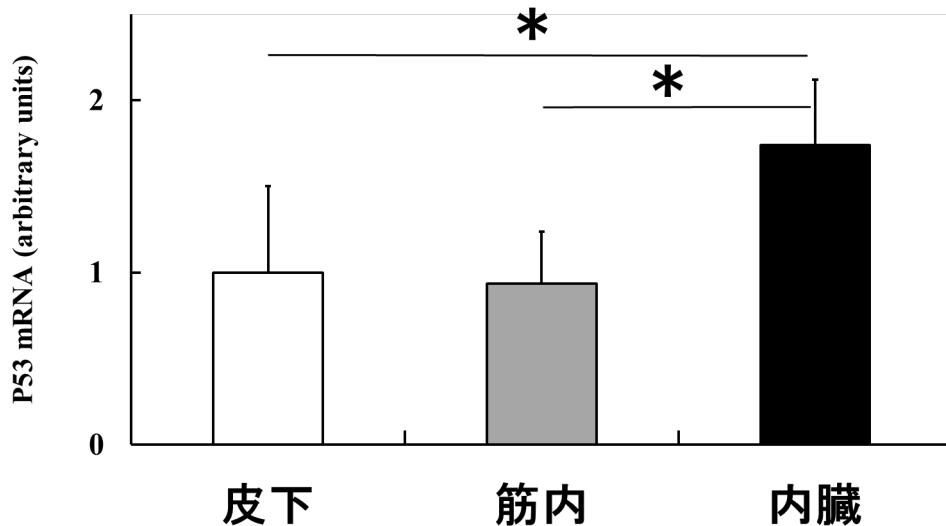


図 1. 黒毛和種肥育牛の脂肪蓄積部位が p53 遺伝子発現に及ぼす影響  
\*P<0.05

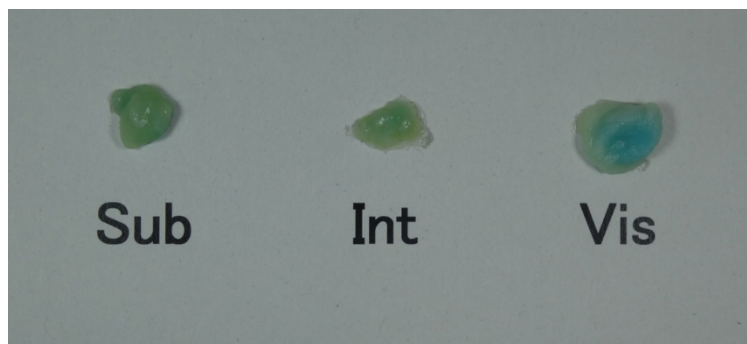
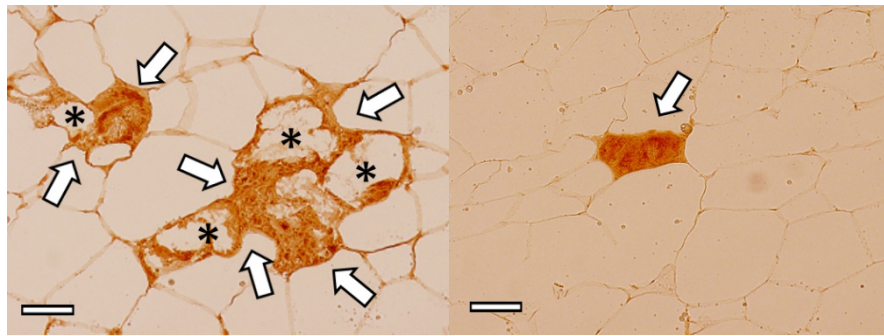


図 2. 黒毛和種肥育牛脂肪組織における SA-βgal 染色  
Sub:皮下脂肪組織、Int:筋肉内脂肪組織、Vis:内臓脂肪組織

(2) 黒毛和種とホルスタイン種肥育牛を比較した結果、皮下脂肪組織のマクロファージ浸潤に品種差は認められなかった。一方、黒毛和種の内臓脂肪及び筋肉内脂肪組織のマクロファージ浸潤は、ホルスタイン種より亢進していた。黒毛和種の内臓脂肪組織ではマクロファージが細胞死した脂肪細胞を環状に取り囲む crown-like structure (CLS) 像が認められたが、ホルスタイン種では CLS 像は認められなかった (図 3)。以上より、黒毛和種の内臓脂肪及び筋肉内脂肪組織では、ホルスタイン種より免疫細胞の浸潤による慢性炎症が亢進していると考えられた。

脂肪組織老化のウシ品種差を検討した結果、皮下脂肪組織では p53 遺伝子発現量に品種差は認められなかった。一方、内臓脂肪組織と筋肉内脂肪組織では、ホルスタイン種と比較し黒毛和種において p53 遺伝子発現が有意に高い値となった (図 4)。加えて、細胞老化マーカーである GLB1、mmp2、mmp9 の発現量は、皮下脂肪では品種差は認められなかったが、内臓脂肪組織と筋肉内脂肪組織では、ホルスタイン種と比較し黒毛和種において有意に高い値であった。さらに、皮下脂肪では細胞老化の指標である SAβ-gal 染色に品種差は認められなかったが、内臓脂肪および筋肉内脂肪では黒毛和種の SAβ-gal 活性がホルスタイン種より高かった。

以上より、ホルスタイン種と比較し黒毛和種の内臓脂肪及び筋肉内脂肪組織では、免疫細胞浸潤ならびに脂肪組織老化が亢進していると考えられた。



## 黒毛和種

## ホルスタイ

図 3. 内臓脂肪組織におけるマクロファージ免疫染色像

白色矢印：マクロファージ

\* : Crown-like structure (CLS) 像

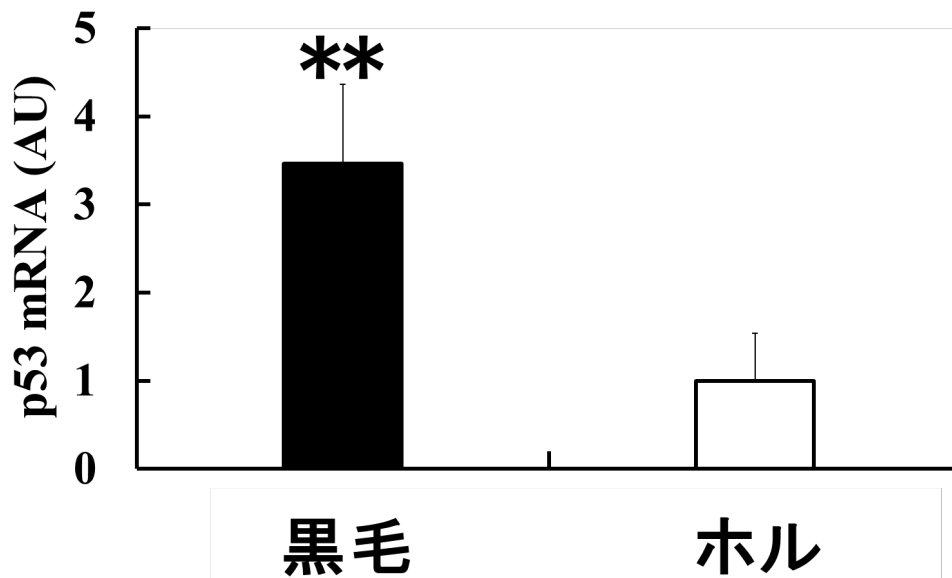


図 4. 内臓脂肪組織における p53 遺伝子発現のウシ品種差

\*\*P<0.01

(3) 肥育牛において、脂肪組織の免疫細胞浸潤および組織老化には蓄積部位の差が存在することが明らかとなった。そこで、これら脂肪蓄積部位が、黒毛和種肥育牛の筋肉内脂肪蓄積状態に及ぼす影響を検討した。黒毛和種肥育牛を、筋肉内脂肪蓄積状態の異なる枝肉格付 A3、A4、A5 毎に分類し、筋肉内脂肪細胞のセルラリティーに及ぼす影響を検討した結果、ロース部位の粗脂肪含量は枝肉格付 A5 が A3 より有意に高く (図 5)、A5 のロース部位の筋肉内脂肪細胞は、A3 の筋肉内脂肪細胞より脂肪細胞のサイズが大きく肥大化していることが明らかとなった (図 6)。

さらに筋肉内脂肪蓄積の度合いを反映するロース BMS ナンバーは、皮下脂肪割合と有意な正の相関が認められたのに対し、内臓脂肪割合とは有意な負の相関が認められた (図 7)。上記の結果は、筋肉内脂肪蓄積の多い黒毛和種肥育牛は、内臓脂肪の割合が低いことを示すものである。これまで本研究で得られた結果から、肥育牛における免疫細胞浸潤による脂肪組織炎症や脂肪組織老化は、内臓脂肪が皮下脂肪より亢進していることが明らかになっている。これらの結果から、肥満状態の内臓脂肪組織における組織炎症や組織老化の亢進によって、内臓脂肪における脂肪蓄積能力が低下し、余剰エネルギー蓄積部位が異所性脂肪である筋肉内脂肪部位に遷移した可能性が推察された。

以上より、ウシにおける筋肉内脂肪蓄積の制御には、内臓脂肪における免疫応答ダイナミクスを介した脂肪組織炎症ならびに脂肪組織老化の状態が影響している可能性が考えられた。

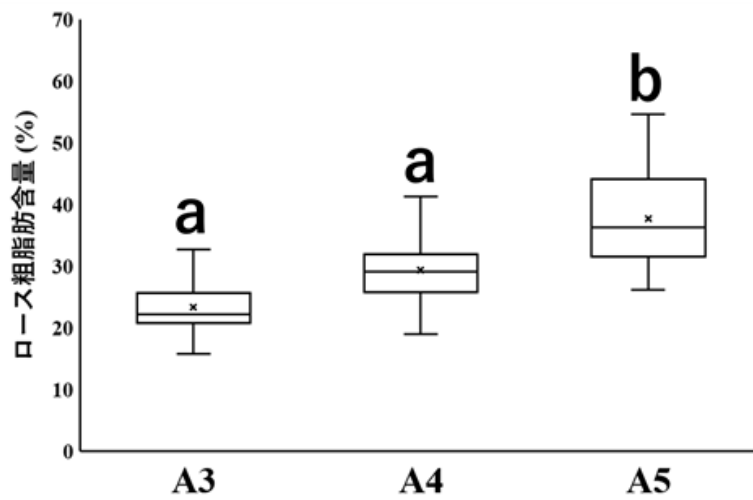


図5. 黒毛和種の枝肉格付毎のロース粗脂肪含量  
a, b:  $p < 0.01$

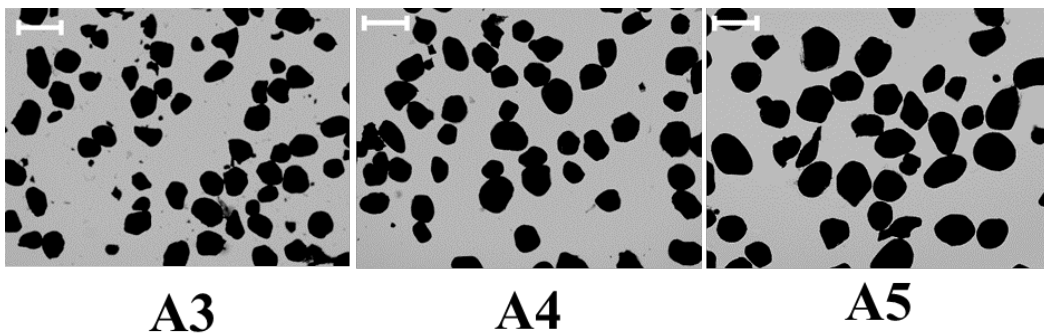


図6. 黒毛和種肥育牛のA3、A4、A5等級におけるロース筋肉内脂肪細胞像

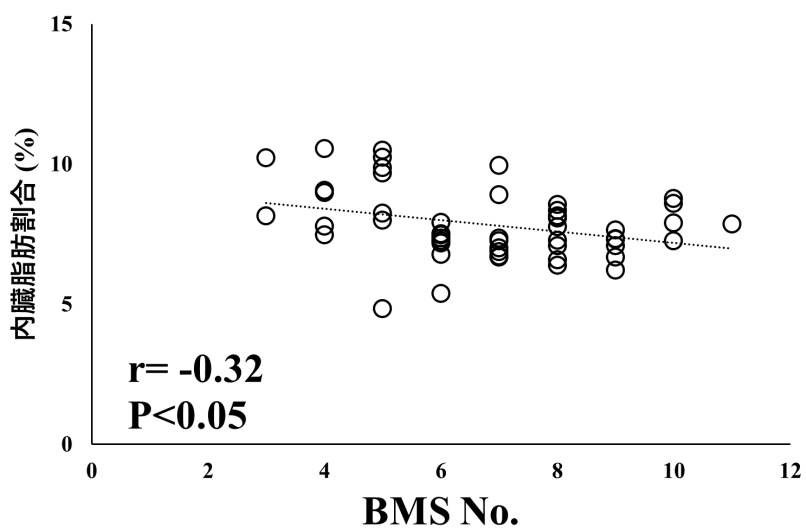


図7. 黒毛和種肥育牛における内臓脂肪割合と BMS No の相関

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomoya Yamada, Mituru Kamiya, Mikito Higuchi	4. 巻 91
2. 論文標題 Fat depot specific effects of body fat distribution and adipocyte size on intramuscular fat accumulation in Wagyu cattle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomoya Yamada, Mituru Kamiya, Mikito Higuchi	4. 巻 91
2. 論文標題 Breed differences in macrophage infiltration and senescence state in adipose tissues of Wagyu and Holsteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomoya Yamada, Mituru Kamiya, Mikito Higuchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolomic Analysis of Wagyu and Holstein Beef	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo10030095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomoya Yamada, Mituru Kamiya, Mikito Higuchi, Naoto Nakanishi	4. 巻 80
2. 論文標題 Fat depot-specific differences of macrophage infiltration and cellular senescence in obese bovine adipose tissues	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1495-1503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------