

平成21年5月29日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700555

研究課題名（和文）メタボリックシンドローム予防因子アディポネクチンと幹細胞及び運動との関連

研究課題名（英文）Relation between metabolic syndrome prevention factor adiponectin and stem cells and exercise

研究代表者

小林 正利 (KOBAYASHI MASATOSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30320154

研究成果の概要：脂肪細胞間に存在する突起を持った骨髄由来細胞が脂肪細胞と密に接していた。この殆どがマクロファージであることを確認し、これらの骨髄由来細胞がアディポネクチン分泌、調整に関与することが示唆された。また、骨格筋においてアディポネクチン受容体は有酸素性解糖能に優れる筋線維での分布が確認されると共に定期的な運動を行うことによって、嫌気性解糖能に優れる筋線維にも分布するようになることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 450,000 | 3,650,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 ・ 応用健康科学

キーワード：生活習慣病、細胞・組織、健康科学、肥満、メタボリックシンドローム、アディポネクチン、アディポネクチン受容体

1. 研究開始当初の背景

肥満は、現代社会の問題となっている所謂メタボリックシンドロームを惹起し、耐糖能障害、高脂血症、高血圧等を誘引し、さらに糖尿病や、糖尿病との関連が深い我が国の死因のトップを占める心血管疾患を引き起こす主要な要因であると考えられている。従って、肥満とインスリン抵抗性の因果関係の解明と糖尿病・

心疾患の予防法や治療法の確立が極めて重要である。

脂肪細胞は従来、余剰のエネルギーを貯蔵するという働きが知られてきたが、近年、レプチン、TNF- α などの生理活性因子であるアディポサイトカインを分泌する内分泌器官としての機能を有することが明らかになってきた。その中でも唯一の善玉であると考えられているアディ

ポネクチンは、主に小型の脂肪細胞から分泌され、抗炎症作用を有する他、骨格筋をはじめとする細胞のインスリン感受性を高め、抗糖尿病ホルモンとしても注目されている。一方、骨髄由来細胞として知られるマクロファージが脂肪組織に浸潤してくると、マクロファージと肥大化した脂肪細胞との相互作用によって炎症が惹起され、インスリン感受性が下がる原因となったり、憎悪したりするという仮説が注目を集め、アディポネクチン分泌とこれらのことの因果関係があるのではないかということが推測されている。また、定期的な適度な強度の運動を継続して行うことは肥満を予防・軽減するだけでなく、骨格筋においてインスリン感受性を高めると考えられている。更に、定期的な運動を続けて行うことは、アディポネクチンと耐糖能との関連において、その受容体の発現を高め且つアディポネクチン感受性を高めることが期待される。

本研究は基礎実験をもとに脂肪細胞と幹細胞(骨髄由来細胞)の関連、また運動が骨格筋においてアディポネクチン感受性の亢進にどのような影響をもたらすのかを形態学的な立場から組織化学的に解明し、メタボリックシンドロームの予防、症状の軽減および改善に関する意義に迫り社会に還元するものである。

2. 研究の目的

- (1) 脂肪細胞において、アディポネクチン分泌抑制に関与すると考えられているマクロファージ(骨髄由来細胞)と脂肪細胞が形態学的にどのようなインターアクションを持つのかを明らかにする。
- (2) 実験動物に自発運動を定期的に行わせた場合、骨格筋におけるアディポネクチン受容体発現にどのような影響をもたらすのかを明らかにする。
- (3) 高脂肪食摂取動物に自発運動を定期的に行わせた場合、脂肪細胞におけるアディポネクチン発現と骨格筋のアディポネクチン受容体発現にどのような影響をもたらすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 目的(1)を達成するため、GFP トランスジェニックマウスから採取した骨髄細胞を、放射線照射により骨髄幹細胞を抑制した同系統の野生型新生仔マウスに静注移植し、骨髄置換マウス(以下 GFP 骨髄キメラマウスと記載する)を作製し、4~14ヶ月後に脂肪組織を採取して伸展標本および凍結切片標本を作製の後、脂肪細胞とGFP陽性骨髄由来細胞との関連を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、骨髄由来細胞のデキストラン取込み能を検討するために GFP キメラマウスの腹腔内にデキストランを投与し、マクロファージとの関連について検討した。併せて、マクロファージマーカーである抗 F4/80 抗体および抗 Iba1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

- (2) 目的(2)を達成するため、①、②の実験を行った。

① 11週齢の Wistar 系雄ラットの前脛骨筋および長趾伸筋について、アディポネクチンの受容体である AdipoR1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、その分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。併せて連続切片をパルプアルブミンに対する抗体を用いて免疫組織化学染色し、筋線維型とも比較検討を行った。

② 7週齢のラットに通常の飼育用餌(CE-2;日本クレア)を4週間自由摂食させ、骨格筋のアディポネクチン受容体の分布について検討すると共に、回転運動飼育ケージにて4週間自由に運動させた動物と通常のケージで飼育した動物で比較検討した。

- (3) 目的(3)を達成するために、ラットに高脂肪食(High Fat Diet 32;日本クレア)を与え、方法(2)と同様の条件で飼育し、骨格筋におけるアディポネクチン受容体の分布局在について通常の餌を与えたものと比較検討するとともに運動の有無との比較検討も行った。

4. 研究成果

- (1) 脂肪組織において骨髄由来細胞と脂肪細胞が形態学的にどのようなインターアクションを持つのかの探索

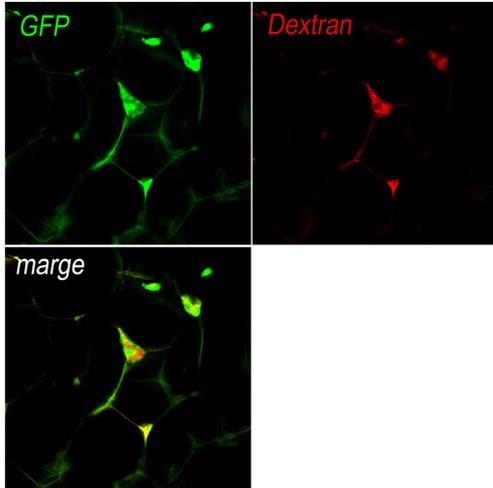


図1. 腹腔内にデキストランを投与した GFP キメラマウスの内臓脂肪

図1に示すように、GFP 骨髄キメラマウスの脂肪組織を共焦点レーザー顕微鏡観察したことにより、脂肪組織内に GFP 陽性の骨髄由来細胞が多数存在し、これらの細胞は突起を有する細胞や血球細胞であると考えられる丸い形をした細胞が認められた。これらのうち突起を有する GFP 陽性細胞は脂肪細胞と密接して存在していた。また、GFP キメラマウスの腹腔内にデキストランを投与後3日に脂肪組織を摘出し、細胞のデキストランの取り込み能について検討した。その結果、脂肪細胞と密接している骨髄由来の GFP 陽性細胞がデキストランの取り込み能することが認められた。デキストラン投与を行っていない GFP 骨髄キメラマウスの脂肪組織をマクロファージのマーカである F4/80 および Iba1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果、GFP 陽性細胞の多くがマクロファージマーカー陽性であった。これらのことから、炎症をおこしていない脂肪組織においても骨髄由来細胞であるマクロファージがかなりの頻度で脂肪細胞と密な

接触をしており、アディポネクチンの分泌調節に何らかの関与をしているのではないかということが示唆された。

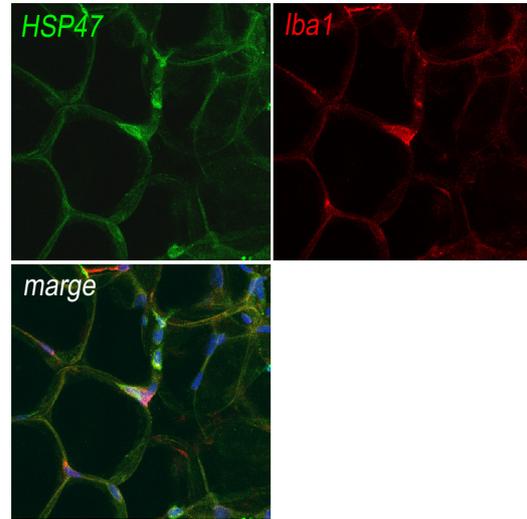


図2. 野生型マウスの内臓脂肪における線維芽細胞 (Hsp47) とマクロファージ (Iba1)

また、我々の研究室では正常組織におけるマクロファージと線維芽細胞との関連についても検討を行っているが、図2に示すように脂肪組織において、Iba1 陽性のマクロファージとコラーゲンを産生する際の分子シャペロンである Hsp 47 に陽性の線維芽細胞とが脂肪細胞の近隣で隣あって密接していることが確認され、マクロファージに加えて線維芽細胞もアディポネクチン分泌調節に何らかの影響を与えている可能性も考えられ、今後更に探求していきたい。

- (2) ラット骨格筋におけるアディポネクチン受容体の局在と運動との関連

①骨格筋におけるアディポネクチン受容体の局在

ラット骨格筋のアディポネクチン受容体の分布、局在を調べるために、骨格筋における受容体であると考えられている AdipoR1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

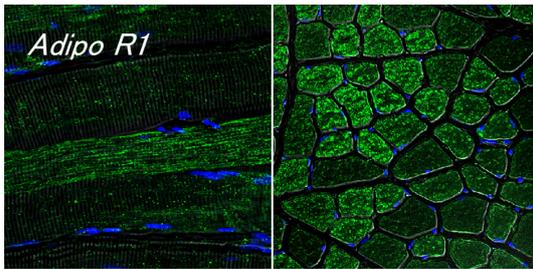


図3. ラット前脛骨筋におけるアディポネクチン受容体 (Adipo R1) の分布
左図；縦断像 右図；横断像

その結果、図3に示すように、ドット状の免疫陽性反応が筋細胞全体に認められ、比較的直径の小さな筋線維が強陽性を示した。

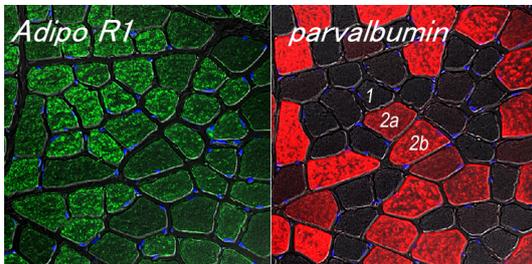


図4. ラット前脛骨筋におけるアディポネクチン受容体 Adipo R1 (左図) の分布と抗パルブアルブミン染色 (右図) による筋線維型との比較

また、これを筋線維型と比較するために我々の研究室でこれまでに行ってきたパルブアルブミンに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。パルブアルブミンはカルシウム結合蛋白の1種で、速筋性線維で、且つ嫌気性解糖能力に優れる type 2b 筋線維で最も多く含まれ、type 2a 筋線維で中等度、遅筋性筋線維で、且つ有酸素性に優れる type1 筋線維には極めて少ないことが報告され、免疫組織化学染色を行うと図4の右図のように染色される。

前脛骨筋の連続凍結切片を作製し、Adipo R1 とパルブアルブミンの分布を比較すると、Adipo R1 陽性を示す細胞は、type1 筋線維および type2a 筋線維であることが明らかとなり、アディポネクチン受容体が分布するこれらの筋線維は有酸素性解糖能力に優れることから、アディポネクチンがインスリン感受性を亢進させることの裏付けともなると考

えられる。

②アディポネクチン受容体の局在と運動との関連

運動を行うことでインスリン感受性が改善することは、よく知られおり、アディポネクチン受容体の分布にも変化が現れることが予想される。そこで、回転飼育ケージにて自由運動を4週間負荷したラットの前脛骨筋の連続切片を作製し、Adipo R1 の分布とパルブアルブミン免疫組織化学染色による筋線維型との比較検討を行った。

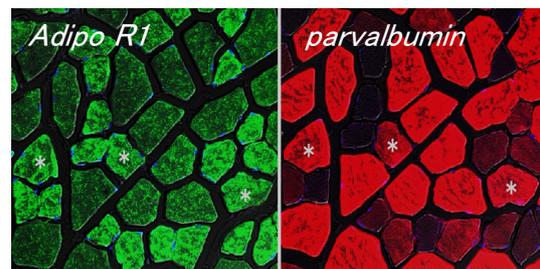


図5. 4週間自由運動後のラット前脛骨筋におけるアディポネクチン受容体 Adipo R1 の分布 (左図) と抗パルブアルブミン染色 (右図) による筋線維型との比較

その結果、図5に示すように、運動を負荷していないものと同様に有酸素性解糖能に優れた type1、type2a 線維に Adipo R1 の強陽性像が確認できた。また、更に加えて、図5の*マークで示した筋線維のように、パルブアルブミン強陽性の筋線維、即ち嫌気性解糖能力に優れる type2b 筋線維にも Adipo R1 の強陽性像が確認された。

このことから、定期的な運動を一定期間行うことによって、有酸素性解糖能力に優れる筋線維だけでなく、無酸素性解糖能力に優れた筋線維においてもアディポネクチンの感受性を亢進させる可能性が示された。

(3)高脂肪食食餌ラット骨格筋におけるアディポネクチン受容体の分布と運動

メタボリックシンドロームは肥満との因果関係が指摘され、アディポネクチン受容体の発現分布に影響することも考えられる。そこでラットに脂質含量32%で、100gあたりのカロリーが通常の

餌の約 1.5 倍である高脂肪食餌を 4 週間与えたものでアディポネクチン受容体の分布の検討を行い。また同じ期間、回転運動ケージにて自由運動を負荷したものについても検討した。

その結果、通常の餌で飼育した 11 週齢の動物の体重は $355.0 \pm 10\text{g}$ であったのに対して、8~11 週齢までの間、高脂肪食を摂取した動物の体重は $397.5 \pm 37.7\text{g}$ であり、通常食摂取群と高カロリー食摂取群の間には有意 ($p < 0.05$) な体重の差が認められた。

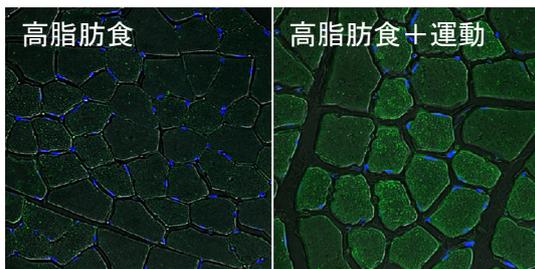


図 6. 高脂肪食摂取ラット前脛骨筋におけるアディポネクチン受容体 Adipo R1 (左図) の分布と 4 週間運動後 (右図) の受容体分布の比較

アディポネクチン受容体分布の検討の結果、高脂肪食を与えた動物の前脛骨筋では AdipoR1 の免疫陽性反応 (図 6 左図) が殆ど認められなかった。また、4 週間自由運動を行ったもの (図 6 右図) では、通常食摂取群と有意な体重の差は認められなかった。しかしながら、アディポネクチン受容体の分布は高脂肪食を摂取して運動を行っていないものに比べ、若干強い反応が認められたが、通常食摂取動物の運動を行っていないもの (図 4 左図) と比較しても、弱い反応しか認められなかった。このことは高カロリー、高脂肪の食事を摂取することは、アディポネクチンの感受性を低くし、ひいてはインスリンの感受性を悪くする可能性を示唆するものであった。

以上の結果より、アディポネクチンの分泌調節に関わると考えられる骨髄由来細胞 (マクロファージ) が脂肪細胞と密接するとともに、線維芽細胞とも接触し、形態学的にもアディポネクチンを含むアディポカインの分泌調節に重要な役割を果たすことが考えられた。

また、定期的な運動を行うことは骨格

筋におけるアディポネクチン感受性の亢進に役立ち、メタボリックシンドロームの予防や改善に有効であることが示唆されるとともに、摂取する食事の内容がアディポネクチン感受性にも関わることが明らかになった。

今後さらに、アディポネクチンを含むアディポカインの分泌調節に関与する細胞の動態や、分子生物学的メカニズムの解明。運動と関連するアディポネクチン感受性亢進の分子メカニズムについて明らかにし、メタボリックシンドロームの予防、症状の軽減および改善の為の基礎的メカニズムを明らかにし、社会に還元していきたい。

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 1 件)

① Takayama T, Kondo T, Kobayashi M, Ohta K, Ishibashi Y, Kanemaru T, Shimazu H, Ishikawa F, Nakamura T, Kinoshita S, Nakamura K., Characteristic morphology and distribution of bone marrow derived cells in the cornea., Anat Rec ., 292, p756-763, 2009, 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

① 田上隆一郎, ラット歯肉結合組織における線維芽細胞とマクロファージ, 第 50 回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会, 2008 年 12 月 6 日, 久留米大学

② 小林正利, イオンエッチング法を利用した免疫組織化学切片の SEM 観察の試み, 第 50 回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会, 2008 年 12 月 6 日, 久留米大学

③ 小林正利, 骨髄における骨芽細胞とその他の細胞の相互関係の観察: 光顕から電顕へ, 日本解剖学会第 64 回九州支部学術集会, 2008 年 10 月 25 日, 福岡大学

④ 太田啓介, マウス真皮への骨髄由来細胞の関与とその細胞構成-骨髄キメラマウスを用いた研究, 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2008 年 10 月 6 日, 長崎大学

⑤ 高山徹也, 角膜に分布する骨髄由来細胞の組織学的観察, 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008 年 3 月 29 日, 大分大学

⑥ 太田啓介, 末梢組織に分布する線維芽細胞と組織常在型マクロファージとの関連, 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008年3月28日, 大分大学

⑦ 小林正利, 骨格筋組織における骨髄由来細胞の分布, 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008年3月27日, 大分大学

⑧ 小林正利, 末梢組織に分布する骨髄由来細胞: 骨格筋組織との関連について, 第62回日本体力医学会大会, 2007年9月14日, ノースアジア大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正利 (KOBAYASHI MASATOSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30320154