

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790111  
 研究課題名 (和文) 多系統マウスを用いた高脂肪食摂取に対する脂肪組織の感受性差のメカニズム解析  
 研究課題名 (英文) Strain differences in susceptibility to high fat diet-induced obesity in mice

研究代表者  
 川上 隆茂 (KAWAKAMI TAKASHIGE)  
 徳島文理大学・薬学部・助教  
 研究者番号：40441589

研究成果の概要：肥満発症の有無を決定する遺伝子を探索するために、多系統マウスを用いて (1) 脂肪組織内における発現変動遺伝子の比較、(2) 小胞体ストレス負荷の感受性差を検討した。(1) マイクロアレイ解析からメタロチオネイン-II (MT-II) 遺伝子が肥満マウスで低下していた。(2) 小胞体 (ER) ストレスが肥満性 2 型糖尿病において増加するが、肝臓では肥満・非肥満を問わず ER ストレスが増加していたが、脂肪組織では差は認められなかったことから更なる検討が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：肥満、感受性差、マイクロアレイ、小胞体ストレス、脂肪組織

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は脂肪細胞の過剰な蓄積と定義され、現在、日本人では推計 2,300 万人に達しているとされる。一般的に、肥満は耐糖能異常、高血圧、高脂血症などを合併するいわゆるメタボリックシンドロームのリスクファクターとして知られている。これまで、国内外の研究および疫学調査から肥満の発症は、遺伝的素因に加えエネルギーの過剰摂取、運動不足およびストレスなどの環境要因と密接な関連性が存在することが報告されている。一方、日本人では欧米人と比較して軽度肥満であるにも関わらず、メタボリックシンドローム

の発症率が高いことが報告されている。このことは、メタボリックシンドローム発症に対して、日本人と欧米人との間に脂肪細胞の質的差異が存在する可能性が考えられる。

近年、肥満性 2 型糖尿病では、小胞体 (ER) 内に異常な立体構造タンパク質が蓄積した状態である ER ストレスが生じていることが報告された (Ozcan, U. *et al.*, 2004)。しかし、高脂肪食摂取による肥満発症・耐糖能異常と ER ストレスの感受性差については不明な部分が多い。ER ストレス負荷を含めた肥満発症メカニズムや脂肪の質的差異の原因を解明することは、メタボリックシンドローム予備

軍を含めた疾病発症のリスク回避に繋がることから重要な課題である。

生体内に存在する脂肪は、白色および褐色脂肪組織に分類される。白色脂肪組織は、主に内臓周囲に存在し、体内に取り込まれた余剰なエネルギーを中性脂肪として蓄積し、体内の要求に応じて遊離脂肪酸として再供給する機能を有している。特に腹腔内臓脂肪の過剰な蓄積はメタボリックシンドローム発症と密接な関連性が認められる。皮下脂肪も内臓脂肪と同様に白色脂肪細胞で構成されるが、内臓脂肪細胞は中性脂肪を蓄積しやすく細胞数が増加しにくい特徴を有するのに対し、皮下脂肪は中性脂肪の蓄積具合は内臓脂肪に劣るが細胞数が増加しやすい。また、一度増加した白色脂肪の細胞数は減少しにくいことが知られている。褐色脂肪組織は、主に肩甲骨や首周りに存在し、ミトコンドリアに富む組織であることが特徴である。体内に蓄積されたエネルギーを熱エネルギーに変換し体外に放出する機能を有することから良性の脂肪組織であることが知られている。褐色脂肪細胞は加齢とともにその重量が減少し、このことが肥満の形成に関与していることが報告されている。

肥満のおよそ90%を占めるのが単純性肥満と称されるエネルギーの過剰摂取や運動不足によるものである。これは、肥満という問題をシンプルに解決する上での好条件であるが、異系統マウスに高脂肪食を摂取させると体重増加や脂肪重量に著しい感受性差が存在することが報告されている (Alexander *et al.*, 2006)。また、肥満を発端とする肥満型II型糖尿病に関与するインスリンやレプチン分泌量にも差が認められる (Alexander *et al.*, 2006, Andrikopoulos *et al.*, 2005)。さらに、高脂肪食餌をC57BL/6Jおよび129S1/SvImJの交雑第二世代マウスに摂取させると動脈傷害 (Aortic lesions) に感受性差が認められ、これについてQTL (quantitative trait loci) 解析から感受性差を生じさせる責任遺伝子の存在場所を報告している (Ishimrori *et al.*, 2004)。これらの報告は、単純性肥満の主たる原因である高脂肪食摂取依存的な脂肪細胞の分化増殖および動脈硬化発症の感受性決定因子が存在することを意味している。

## 2. 研究の目的

個体の感受性差の問題は、肥満の発症あるいはその予備軍においても行政・厚生上重要な課題である。これまで当研究室では、129Sv系マウスに高脂肪食餌を27週間摂取させても体重増加・内臓脂肪重量に関して対照食餌群との差が認められないことを見出している。一方、C57BL/6J系マウスでは長期間の高

脂肪食餌群では対照食餌群と比較して、著しい体重ならびに白色脂肪重量の増加が報告されている。これらの知見および前述した研究報告は、異系統マウス間では高脂肪食餌摂取による肥満発症に対する応答性の異なる感受性決定遺伝子が存在すること、あるいは肥満応答性遺伝子発現後の生体内での作用 (肥満発症や疾病発症) 過程に遺伝背景の差が寄与していることを示唆している。しかし、脂肪蓄積や脂肪細胞の質に対する感受性差を規定する因子や責任遺伝子を同定した詳細な報告はない。

本研究の目的は、6種類の多系統マウスに高脂肪食餌を摂取させ、

- (1) 肥満発症の系統差、
- (2) アディポカインタンパク量の測定、
- (3) 組織学的検討、
- (4) 脂肪組織における遺伝子発現変動解析 (DNA マイクロアレイ解析)、
- (5) 肝臓および脂肪組織における小胞体ストレスシグナルの感受性差

について検討をおこなうことで、肥満発症についてはメタボリックシンドローム発症の予防やその対策に寄与することである。

## 3. 研究の方法

### 供試動物および食餌

遺伝学的に均一である8週齢、雄性のAKR (AK)、C57BL/6J (B6)、DBA/2J (D2)、A/J (AJ)、C3H (C3) およびBalb/c (BA) マウスに対照食餌および高脂肪食餌を自由摂取させ、短期影響として4週間、および長期影響として23週間飼育した段階で解剖をおこなった。各系統の対照食餌群および高脂肪食餌群について9~11匹のマウスを用いた。高脂肪食餌 (507.6 kcal/100g) は日本クレア社製のHigh Fat Diet32 (HFD) を使用し、対照食餌 (347.2 kcal/100g) には、牛脂成分以外について高脂肪食と形状・組成をほぼ同じにした食餌を使用した。高脂肪食餌は油脂の酸化が進みやすいため、2日に1度交換をおこなった。

### 1) 高脂肪食摂取による多系統マウスの肥満発症の感受性差

飼料を与えはじめてから、週一回ごとに各系統マウスの体重を測定した。各時期の解剖時に、腹腔内臓脂肪・皮下脂肪・褐色脂肪細胞および肝臓を摘出し臓器重量を測定した。摘出した臓器の一部は、速やかに組織固定液に浸漬させ、残りの臓器は、液体窒素による凍結をおこない解析時まで-80°Cで保存した。

## 2) 空腹時血糖、インスリン値およびアディポサイトカインタンパク量の解析

解剖前に6時間絶食し、解剖時に空腹時血糖を測定した。採取した血液は凝固後、遠心操作により血清を得、インスリン、アディポネクチンおよびレプチンタンパクの発現量について各測定キットを用いて解析をおこなった。

## 3) 脂肪組織の組織学的検索

解剖後、組織固定をおこなった腹腔内蔵・皮下および褐色脂肪組織は、定法に従いパラフィン包埋後、厚さ3  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色をおこない組織学的検索をおこなった。各系統間における脂肪細胞数および細胞の大きさを観察し、1細胞あたりの脂肪の大きさについて画像解析ソフトウェアを用いた比較をおこなった。

## 4) ジーンチップを用いた高脂肪食応答性遺伝子のプロファイリング

肥満発症のフェノタイプに対して著しい感受性が認められた異系統間マウス (B6、D2 および C3H マウス) について、GeneChip (Affymetrix 社製) を用いた脂肪組織間におけるマイクロアレイ解析をおこなった。また、マイクロアレイ実験から得られた結果の解析は、データマイニングツール (北海道システムサイエンス) を使用した。

## 5) 肝臓、骨格筋および脂肪組織における小胞体ストレスマーカーの比較

マウス肝臓から定法によりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法を用いて小胞体ストレスシグナルである GRP78、CHOP および GADD34 タンパク発現量を測定した。また、骨格筋および脂肪組織より Total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて上記遺伝子の発現量について検討をおこなった。

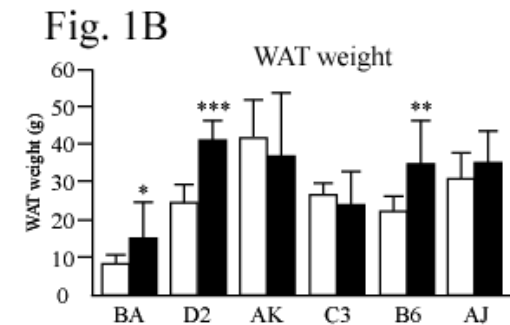
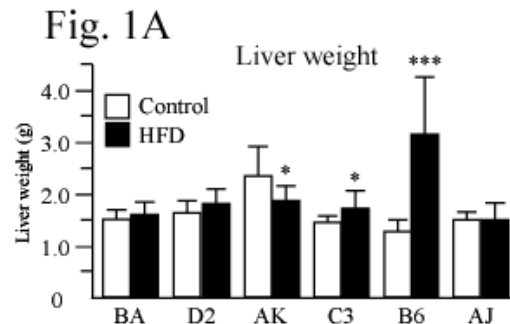
## 統計処理

統計解析は、エクセル統計 2006 ((Social Survey Research Information Co., Ltd) を用いておこなった。各系統間の解析は、Student's t 検定を用いておこない、 $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## 4. 研究成果

### 1) 高脂肪食摂取による多系統マウスの肥満発症の感受性差

AK、C3 及び B6 マウスの HFD 群では、Control 群と比較して、肝重量の有意な増加が認められた (Fig. 1A)。また、WAT に関して、BA、D2 及び B6 マウスの HFD 群では、Control 群と比較して有意な増加が認められ、D2 と B6 マウスでは同程度の肥満を示した。一方、他のマウス系統は、23 週間の高脂肪食摂取による WAT の有意な増加を示さなかった (Fig. 1B)。



平均値 $\pm$ SD。一群は 9~11 匹のマウスを用いた。

### 2) 空腹時血糖、インスリン値およびアディポネクチンタンパク量の解析

高脂肪食摂取に対する空腹時血糖値および血清インスリン値に対する感受性差について検討をおこなった。B6 マウスの HFD 群では、Control 群と比較して、空腹時血糖値及び血漿インスリン値の有意な上昇が認められた。このことから、B6 マウスでは 23 週間の HFD 摂取により、インスリン抵抗性を示すと考えられた。D2 マウスでは血糖値の有意な低下が認められた。また、その他の系統においては血糖値およびインスリン値の有意な差は認められなかった (Fig. 2A および 2B)。

近年、脂肪組織はアディポサイトカインと称される生理活性物質を分泌する器官であることが報告されている。白色脂肪組織への中性脂肪の過剰蓄積は肥満の本体であるが、さらに様々な因子が加わることでアディポサイトカインの分泌バランスが破綻し、メタボリックシンドローム発症の基盤となることが知られている。本研究では、インスリン感受性を改善することが報告されているアディポネクチンおよびレプチンの血清タンパク量について検討をおこなった。結果、白色脂肪組織におけるアディポネクチン値は、全ての系統間で有意な差は認められなかった（データ未掲載）。一方、D2、C3、AJ および B6 マウスにおいて血清レプチン値の有意な増加が認められたことから（Fig. 2C）、これらの系統はレプチン耐性となっている可能性が示された。また、高脂肪食摂取による WAT 重量の有意な増加を示さない C3 および AJ マウスにおいて高レプチン値が認められたことから、レプチン分泌異常は、必ずしも肥満を伴わないことが考えられた。

Fig. 2A

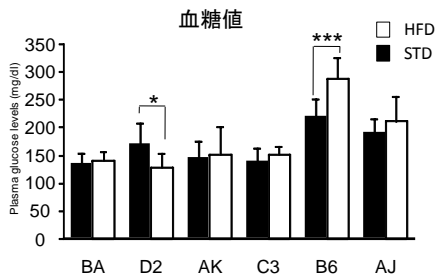


Fig. 2B

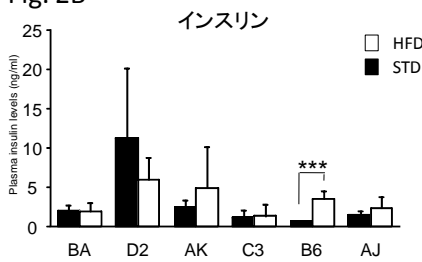
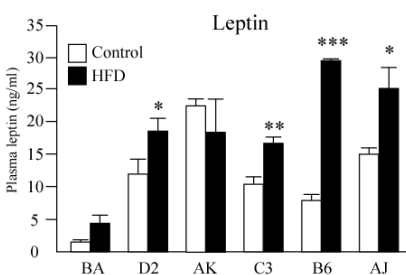


Fig. 2C



平均値±SD。一群は 6~8 匹のマウスを用いた。  
(\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ )

### 3) 脂肪組織の組織学的検索

易肥満モデル(D2 及び B6 マウス)と難肥満モデル(AK 及び C3 マウス)の精巣周囲の WAT の細胞サイズについて、HE 染色法を用いた観察を行った (Fig. 3A)。HFD 摂取により D2 及び B6 マウスでは、対照群と比較して WAT 組織の著しい肥大化が観察された。一方、C3 マウスでは脂肪細胞の肥大化は認められなかった (Fig. 3B)。これらの結果は、WAT 重量との相関性を示していることから、高脂肪食摂取による肥満および抵抗性マウスであり、肥満発症の感受性差を検討するうえで有用なモデル動物であることを示した。

Fig. 3A

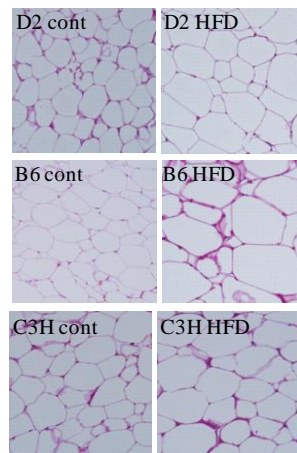


Fig. 3B

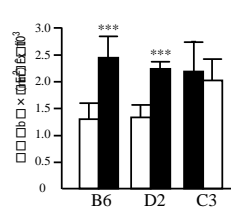


Fig. 3A: 各系統マウスの白色脂肪組織の HE 染色像。B: 各系統マウスの脂肪細胞面積 ( $\mu\text{m}^2$ ) 平均値±SD。一群は 3~4 匹のマウスを用いた。

### 4) ジーンチップを用いた高脂肪食応答性遺伝子のプロファイリング

易肥満および肥満抵抗性マウスにおける遺伝子発現プロファイルを比較する目的で、対照群および高脂肪食の脂肪組織から Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイをおこなった。35,000 個のプロブから 2 倍以上発現量が増加あるいは低下した遺伝子を抽出した。B6 マウスでは 250 遺伝子 (up:119、down:131)、D2 マウスでは 118 遺伝子 (up:82、down:36) および C3H マウスでは 346 遺伝子 (up:243、down:103) であった。易肥満マウスは、メタロチオネイン-II (MT-II) 遺伝子の著しい低下を示した。マウスでは 4 種類のメタロチオネインが存在するが、MT-II 遺伝子の肥満発症に対する影響は不明であり、細胞レベルでの解析が必要であると考えられた。

5) 肝臓、骨格筋および脂肪組織における小胞体ストレスマーカーの比較

小胞体 (endoplasmic reticulum:ER) ストレスは何らかの原因により ER 内に異常な立体構造タンパク質が蓄積した状態であり、これは肥満、2型糖尿病及びインスリン抵抗性惹起との関連性が報告されている (Özcan,U. et al.,2004)。高脂肪食摂取させた肝臓では、肥満および抵抗性マウスで小胞体ストレスマーカーである BiP/GRP78 及び CHOP タンパク発現量の有意な上昇が認められ (Fig. 5A、B および C)、Özcan らの結果と一致した。一方、脂肪組織及び骨格筋では全てのマウス系統では ER ストレスマーカー遺伝子 mRNA 発現量に差はなかった (Table 1)。このことから、高脂肪食摂取による肥満では、小胞体ストレス発現度は組織により異なり、肝臓は感受性が高いことが示唆された。また、高脂肪食摂取により小胞体ストレス負荷状態となっても、必ずしも肥満、高血糖を認めなかったことから、その発症には他の遺伝的要因も寄与することが考えられた。

Fig. 5A

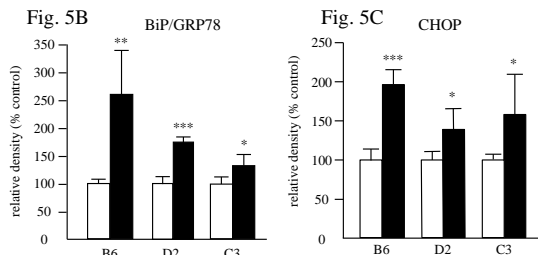
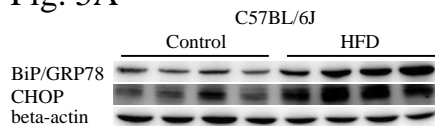


Fig. 5A は、B6 マウスの肝臓における BiP/GRP78 および CHOP タンパク発現量の比較。

Table 1

Genes		B6	D2	C3
WAT	BiP/GRP78	88±45	103±3	114±9
	CHOP	91±19	76±4	76±12
	GADD34	63±16	111±8	129±24
skeletal muscle	BiP/GRP78	81±22	93±4	106±17
	CHOP	111±12	95±11	85±6
	GADD34	98±8	121±38	89±6

Table. 1

Control 食餌群を 100 とした時の脂肪組織および骨格筋における各遺伝子の mRNA 発現量の比較。平均値±SD。一群は 3~4 匹のマウスを用いた。

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 2 件)

Kawakami T, Ito T, Ohsako S, Shiizaki K, Murakami Y, Hirowatari K, Sato M, Tohyama C. Possible involvement of arylhydrocarbon receptor variants in TCDD-induced thymic atrophy and XRE-dependent transcriptional activity in Wistar Hannover GALAS rats. J Toxicol Sci, 有, 34(2), 2009, 209-20

Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. Biochem Pharmacol, 有, 15;77(4), 2009, 660-9

[学会発表] (計 2 件)

高崎 智士, 川上 隆茂, 砂川 美佳, 門田佳人, 鈴木 真也, 佐藤 政男 「高脂肪食摂取における小胞体ストレス発現の組織及び系統特異性」日本薬学会 2009.3.27 京都

川上 隆茂 「肥満発症におけるメタロチオネイン mRNA 発現の系統差」メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007.9.28-29 徳島

[図書] (計 1 件)

川上 隆茂 社団法人日本薬学会 ファルマシア 2007 2 ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 隆茂(KAWAKAMI TAKASHIGE)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：40441589