

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21700761

研究課題名（和文） 社会的ストレスに起因した肥満のプレバイオマーカー探索

研究課題名（英文） Investigation of pre-biomarker for social stress-inducible obesity in mice

研究代表者

榊原啓之（SAKAKIBARA HIROYUKI）

研究者番号：20403701

研究成果の概要（和文）：床敷量を通常の 1/20 に減らした条件下で、3 カ月間マウスを単独飼育したところ、対象群（5 匹/ケージ）と比較して、脂肪蓄積による肝肥大を伴った内臓脂肪蓄積型の肥満が惹起されること、血中クレアチンキナーゼやプラスミノゲン活性化抑制因子（PAI-1）が、ストレス性肥満を予測できるプレバイオマーカーとなりうることを見出した。また、ストレス負荷により上昇した PAI-1 により、睡眠が攪乱される可能性は少ないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mice were singly housed with reduced bed-volume for 3 months. Their body and visceral fat weights were significantly increased in combination with hepatic hypertrophy because of lipid deposition comparing to the control (5 mice/cage). The alterations of blood creatine kinase and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) levels were suggested to might be used as pre-biomarker for social stress-inducible obesity. Additionally, PAI-1 increased under stressful events might not affect on sleep disturbance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、ストレス性肥満、食品由来因子、プレバイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我々は極めて多様な心理・社会的ストレス要因が氾濫している環境下で生活している。そして、これらのストレスへの慢性的な暴露が様々な疾患、例えばうつ病などの精神疾患を惹起すると考えられている（Anisman and Zacharko, *Behav Brain Sci.*, **5**, 89-137, 1982）。従って現代社会で生きる我々が、高い生活の質（QOL）を維持するためには、如何にして日常生活におけるストレスから身

を衛るかの対策が重要課題の一つとされる。一方、“肥満”は QOL を著しく低下させる。というのも、肥満はほとんどすべての生活習慣病（糖尿病、高血圧、脳・心臓血管系疾患等）の温床となっている（メタボリックシンドローム）。肥満の原因は、遺伝、食べ過ぎ、運動不足、編食等が複雑に絡み合った結果であると考えられているが、近年、心理・社会的ストレスが摂食量を増加することで肥満を促進するとの結果が報告されている

(Adam and Epel, *Physiol. Behav.*, **91**, 449-458, 2007)。逆に、ストレス負荷により体重は減少するとの知見もある (Hao et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **68**, 273-281, 2001)。このような相反する結果は、動物の種類 (ヒトの場合、遺伝的背景を含む)、負荷するストレスの種類と期間等によって様々に変化することを推測させるが、いずれにしてもストレス性肥満に関しては未解明な点が多い。また、動物モデルを用いた試験から、ストレス性肥満の誘導メカニズムとして、ストレスが負荷したときに視床下部-下垂体-副腎皮質系を介して分泌されるグルココルチコイドの関与が推察されている (Dallman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11696-11701, 2003)。しかしながら、グルココルチコイドの分泌は一過的かつストレス応答の一つと考えられるため、ストレス性肥満の特異的なマーカーとは考えにくい。従って、QOL を高めることを目指した挑戦の一つとして、ストレス性肥満を予防できる手段を探求していくためには、まずはそれを評価できる最適な手法を確立することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、日常生活で慢性的に暴露される心理・社会的ストレスに起因したストレス性肥満の発症を予測できるプレバイオマーカーを見出すとともに、得られたマーカーを用いてストレス性肥満を未然に防ぐことができる食品由来因子を探索することを目的として研究を推進した。

3. 研究の方法

本実験は静岡県公立大学法人静岡県立大学動物実験指針に従い実施した。

◇マウスへの社会的ストレス負荷方法◇

Miyashita 等の方法 (BBRC, 349, 775-780, 2006) を参考に、4 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを搬入後、10 日間の順化期間を経て単独隔離 (1 匹) の飼育条件により、マウスにマイルドなストレスを負荷した。マウスは、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 2\%$ 、12 時間の明暗サイクル (明期 8:00-20:00) の環境下で、水道水と標準動物飼料 (10 kcal% fat; D12450B, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA) の自由摂取にて飼育した。また、単独隔離群のケージ内の床敷量は、不安回避行動を制限することで孤独感を高めるために、コントロール群 (5 匹/ケージ) の約 20 分の 1 (2 g) に減らした。さらに、外界からの刺激を受けにくいように、各ケージを発泡スチロールの箱で覆った。週に 1 度

の体重測定、週に 2 度の床敷き交換を行った。なお、これらの作業は、17:00~19:00 の時間帯に実施した。

◇試料採取◇

ストレス負荷開始後 13 週目の 17:00-19:00 にマウスをエーテル麻酔下で開腹し、腹部大静脈より採血を行った。採取した血液は、ヘパリン処理したチューブ内に入れ、速やかに遠心分離 ($1,200 \times g$, 10 分) することで得た血漿画分を、血液分析まで -80°C 下で保存した。採血後、肝臓を摘出し、RNAlater に浸し、 4°C で一晩静置後、 -20°C で以下に示す RNA 抽出まで保存した。また、肝臓の一部を 10%ホルマリン溶液中に保存した。

◇血液分析◇

7 種類の因子 (AST 活性、ALT 活性、ALP 活性、トリグリセリド、遊離脂肪酸、総コレステロール、クレアチンキナーゼ活性) の測定は、和光純薬工業株式会社の測定キットを用い、自動分析装置 (TBA-120FR, Toshiba Co., Tochigi, Japan) にて測定した。レプチン、アディポネクチンおよびインスリンの測定は、それぞれマウス Morinaga Institute of Biological Science, Inc. (Kanagawa, Japan)、Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd (Tokyo, Japan) および Mercodia AB (Uppsala, Sweden) の ELISA キットを用いて行った。また、コルチコステロンは Assay Designs 製の EIA キットを用いて測定した。

◇肝臓中の遺伝子発現解析◇

RNA later に保存しておいた各マウスの肝臓組織から、QuickGene RNA tissue kit SII (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて Total RNA の精製を行った。Prime Script RT reagent kit に添付のプロトコールに従い、Takara PCR Thermal Cycler Dice mini を用いて RNA の逆転写を行った。得られた cDNA を、Applied Biosystems Real Time PCR 7500 System で、各標的遺伝子の Taq Man プライマー・プローブを用いて遺伝子発現を解析した。

◇肝臓中の脂肪染色◇

10%ホルマリン溶液中に保存した肝臓を用いて、Oil-red O 染色法により脂肪染色を行った。

◇暗期にマウスへ負荷されるストレスを軽減できる実験環境の確立◇

4 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを搬入後、1 ケージあたり 5 匹で順化した。マウスは 12 時間の明暗サイクル (明期の照度、250 lx) に調整した動物個別飼育装置 (LP-30CCFL-8ARS, Nippon Medical &

Chemical Instruments, Osaka, Japan) 内で飼育した。明期 (ZT6) に床敷交換等のアニマルケアを2週間おこなった後、ZT6 および暗期 (ZT18) に採血し、血中コルチコステロン濃度を測定した。暗期の解剖は、光の影響を防ぐために、マウスが光を知覚しにくい赤色光下 (≤ 20 lx) にて実施した。次に、マウスを搬入後、ZT18 に床敷交換等のアニマルケアを2週間ないしは4週間おこない、同様に ZT18 に採血した。

◇PAI-1 の体内挙動◇

雄性 C57BL/6 マウス (6 週齢) を 12 時間周期の明暗サイクルに設定した動物個別飼育装置内にて飼育した (明期 11:00–23:00)。4 週間の順化期間を経た後、ZT6 に recombinant mouse PAI-1 を 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で腹腔内投与し、投与直後 (0 分)、投与 10、30、60 および 120 分後に採血した。クエン酸処理したチューブに採取した血液を入れた後、速やかに遠心分離 (1,200 \times g、10 分間) することで血漿画分を得た。血漿中 PAI-1 濃度は Murine PAI-1 Total Antigen Assay kit (Molecular Innovations, Novi, MI, USA) を用いて実施した。

◇PAI-1 の覚醒作用測定◇

雄性 C57BL/6 マウス (23–27g) を順化後、Kimura 等の方法 (*Mol. Psychiatry*, 15, 154-165, 2010) に従って、頭部に測定用電極を移植した。マウスは、12 時間周期の飼育室 (明期 5:00–17:00) にて飼育した。2 週間後、ZT6 に、recombinant mouse PAI-1 を 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で腹腔内投与し、その後 24 時間の覚醒割合を測定した。

4. 研究成果

マウスへ社会的ストレス (単独隔離ストレス: 床敷量を通常の 1/20 に減らしたケージ内に 1 匹) を負荷したところ、9 週目より体重の増加が始まり、13 週目にはその変化は有意となった (表 1)。また、この時のストレス負荷群の内臓脂肪重量および肝重量は、対照群 (5 匹/ケージ) と比較して有意に高かった。Oil-red O 染色の結果より、ストレス負荷による肝肥大は肝臓組織への脂肪蓄積に起因していると考えられた (図 1)。ストレス負荷群で、総コレステロール値が上昇したが、これは一般的な肥満状態で見られる現象と同じである。一方、トリグリセリド値については減少した。この理由は不明であるが、もしかすると、肝臓への蓄積が原因の一つかもしれない。肝障害の血液マーカーである AST 活性や ALT 活性の上昇が見られなかったことから (表 1)、本研究で見られた肝肥大は著しい肝障害を伴った現象ではないと考えられる。ストレス負荷 1 ヶ月の地点では、スト

表 1. 13 週間の単独隔離飼育が体重、臓器重量、血中パラメーターにおよぼす影響

	対照群 (5匹/ケージ)	ストレス群 (1匹/ケージ)
体重 (g)		
開始時 (0週目)	21.2 \pm 0.2	20.9 \pm 0.3
解剖時 (13週目)	35.2 \pm 0.6	38.0 \pm 0.8*
臓器重量 (mg/g 体重)		
肝臓	39.4 \pm 1.1	47.4 \pm 1.3*
内臓脂肪	83.2 \pm 2.3	90.0 \pm 2.5*
副腎	0.099 \pm 0.005	0.093 \pm 0.006
胸腺	1.83 \pm 0.08	1.59 \pm 0.06
血中パラメーター		
AST (IU/L)	97 \pm 8	102 \pm 8
ALT (IU/L)	58 \pm 7	80 \pm 11
ALP (IU/L)	184 \pm 5	189 \pm 6
トリグリセリド (mg/dL)	64 \pm 3	56 \pm 1*
遊離脂肪酸 (mEq/L)	831 \pm 55	549 \pm 19*
総コレステロール (mg/dL)	183 \pm 7	201 \pm 5*
クレアチンキナーゼ (U/L)	1768 \pm 470	593 \pm 102*
コルチコステロン (ng/mL)	101.8 \pm 4.6	60.4 \pm 1.7*
アディポネクチン ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	27.2 \pm 1.4	20.8 \pm 1.0*
レプチン (ng/mL)	32.4 \pm 3.5	34.6 \pm 2.3
インスリン ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.2 \pm 0.3	3.6 \pm 0.3

平均値 \pm 標準偏差 (n=15) で表示。*P<0.05 vs 対照群 (t-検定)

レス群の体重増加は見られなかったが、運動時に分泌が促進されるクレアチンキナーゼ活性の低下、さらにプラスミノゲン活性化抑制因子 1 (PAI-1) の血中レベルが上昇したことから (data not shown)、これら 2 つのパラメーターおよびその他の血中パラメーターの変動を総合的に追跡することで、ストレス性肥満を予測できる可能性があると考えた。

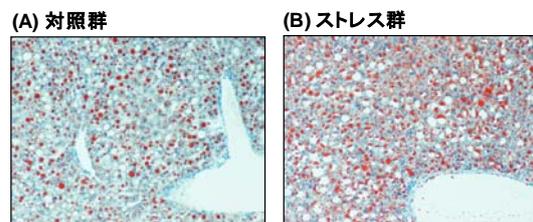


図 1. マウスへの 13 週間のストレス負荷による肝臓への脂肪蓄積 (Oil-red O 染色)

さらに、肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の発現量について測定したところ、脂肪酸合成関連遺伝子 (*Srebf1*, *Fasn*, *Elovl6*) の発現が抑制され、そして脂肪酸分解関連遺伝子 (*Ppara*, *Acox1*, *Ehhadh*) の発現が促進していた。これは、申請者を含むグループが以前に報告したストレス負荷 1 ヶ月の遺伝子発現パターンと逆であった (Motoyama et al., *Physiol. Genom.*, 37, 79-87, 2009)。この結果は、ストレス負荷開始直後、少なくとも 1 ヶ月迄はストレスに対する防御反応の為、身体はエネルギー蓄積の方向へ働くのに対し、体重増加に伴い、その体重増加を防ぐ反応として、これら脂肪酸合成/分解遺伝子の反応が逆転したことが考えられる (ストレスに対する適応応答)。これは、ストレス負荷時に分泌が促進されることが知られているコルチコステロン値が、3 カ月間のストレス負荷群において

顕著に低いとの結果（表1）からも推察される。

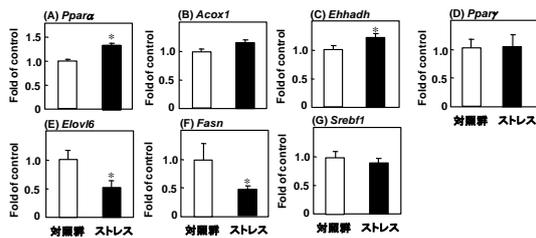


図2. マウスへの13週間のストレス負荷が肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の発現量に及ぼす影響。

A) *Ppara*, peroxisome proliferator activated receptor α ; B) *Acox1*, acyl-coenzyme A oxidase 1; C) *Ehhadh*, enoyl-coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase; D) *Ppar γ* , peroxisome proliferator activated receptor γ ; E) *Elovl6*, ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids; F) *Fasn*, fatty acid synthase; and G) *Srebf1*, sterol regulatory element binding factor 1. 各遺伝子発現量は、内在性コントロール (*Gapdh*) で補正した後、コントロール群に対する相対値で表示。平均値±標準誤差(n=15)。* $P < 0.05$ vs 対照群。

マウスを含めたげっ歯類は、我々ヒトと異なり、夜行性動物である。故に、ストレス応答を追跡する試験についても、通常の動物試験が実施される明期（睡眠期）だけでなく、暗期（覚醒期）の反応についても評価する必要がある。しかしながら、ヒトは暗闇の中で作業はできない。一方、光がストレス刺激となることが知られている為、暗期の試験時の室内に照明を灯すことは避けるべきである。そこで、暗期にストレス応答が生じず、かつ実験従事者が作業できる環境を整備したところ、

- 1) マウスが認識しにくい波長領域の光（630nm以上の光）を使用する（ ≤ 20 lux）
 - 2) 外界の時間帯が暗期となるように、動物室の明暗サイクルを逆にする場合、その環境に適応する為には、4週間の順化期間を設ける
 - 3) 暗期（活動期）に外界からの刺激に慣れさせるために、暗期に床敷交換等の作業を実施する
- 事で、本目的を達成できる事を見出した。

ストレス負荷により上昇するPAI-1に着目し、ストレス性疾患の初期に見られる睡眠攪乱作用について検討した。PAI-1（20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重）を腹腔内投与したところ、血中のPAI-1レベルは速やかに上昇し、投与後1時間以内に定常レベルに戻ることが判った（図3）。次に、同量のPAI-1を睡眠期である明期（ZT6）に腹腔内投与し、その後の覚醒割合を追跡すると、溶媒対象群（生理食塩水投与群）と比較して、覚醒割合は上昇する傾向を示したが

（図4）、有意な差ではなかったことから、ストレス負荷により上昇する血中PAI-1が、睡眠攪乱を惹起する可能性は少ない事が示唆された。

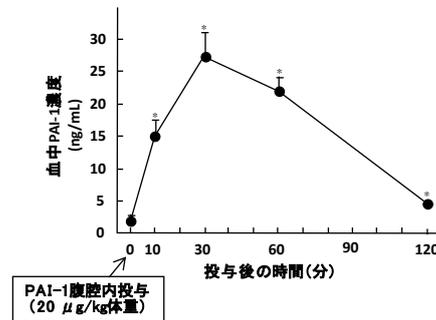


図3. PAI-1をマウスの腹腔内へ20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与した後の血中PAI-1レベルの推移。平均値±標準誤差(n=3)。* $P < 0.05$ vs 投与直前(0分)。

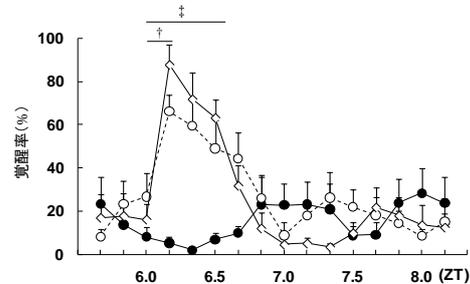


図4. PAI-1投与がマウスの覚醒レベルに及ぼす効果。PAI-1をマウスの腹腔内へ、ZT6に投与した後の覚醒パターンを示す。●、未投与群；○、生理食塩水投与群；◇、PAI-1(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)投与群。†と‡は、それぞれ生理食塩水投与群とPAI-1投与群の投与前の覚醒割合に対する有意差 ($P < 0.05$)があることを示す。平均値±標準誤差(n=8)。

本研究で用いた単独隔離ストレス負荷時に、マウスへウコンを常食させたところ、ストレス負荷が誘発する肥満の発症を減弱させる可能性が示された。また、主要なフラボノイドであるケルセチンを豊富に含むセントジョーンズワートを常食させると、ストレス負荷1ヶ月における血中コルチコステロン分泌の上昇を抑制した。これら2種類の成分を常食することにより、ストレス性肥満を抑制できる効果が期待できる。さらに、様々な効能があるアントシアニン類が、摂取後、肝臓中に移行することから、今後はアントシアニン類にも着目して研究を進めていきたい。

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 4)

- 1) Sakakibara H., Ogawa T., Koyabagi A., Kobayashi S., Goda T., Kumazawa S., Kobayashi H., and Shimoi K., Distribution and excretion of bilberry anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 57(17), 7681-7686 (2009), 査読有
- 2) Sakakibara H., Miyashita T., Matsui A., Ozaki A., Suzuki A., Ikeda T., Morishita K., and Shimoi K., Effects of St John's Wort extracts on corticosterone levels dysregulated by social isolation stress, *J. Trad. Med.*, 26(2), 86-92 (2009), 査読有
- 3) Sakakibara H., Koyanagi A., Suzuki T., Suzuki A., Lin L., Shimoi, K., Effects of Animal Care Procedures on Plasma Corticosterone Levels in Group-housed Mice during the Nocturnal Active Phase, *Experimental Animals*, 59(5), 637-642 (2010), 査読有
- 4) Sakakibara H., Romanowski CPN, Jakubcakova V, Flachskamm C, Shimoi K., Kimura M., Feeble awake effects of plasminogen activator inhibitor type-1 in mice, *Behavioral Brain Research*, 220(2), 354-357 (2011), 査読有

〔学会発表〕 (計 13 件)

- 1) Sakakibara H., Suzuki A., Kobayashi A., Matsui A., Koyanagi A., Sayama K., Koto A., Ohashi N., Akimoto M., Nakayama T., Shimoi K., Loss of social interaction induces obesity in mice, The 2nd International Conference on Health and Longevity Sciences, 2009/10/24-27, Shizuoka, Japan.
- 2) 榊原啓之、ビルベリーアントシアニンの体内動態、第 3 回眼抗加齢医学研究会講習会、ランチョンセミナー、2009 年 11 月 3 日、東京ステーションコンファレンス (東京)
- 3) 榊原啓之、小柳顯陽、松井朝子、鈴木敦美、本山径子、下位香代子、外部刺激に対する生体応答の評価-マウスを用いた時間生物学的アプローチ-、安全性研究会冬の学校、2009 年 12 月 5 日 (東京)
- 4) Sakakibara H., Ogawa T., Ogawa, K., Koyanagi A., Kobayashi S., Goda T., Kumazawa S., Kobayashi H., Shimoi K., Absorption and excretion of bilberry anthocyanins in mice, 4th International Conference on Polyphenols and Health, 2009/12/7-11, Harrogate International Center,

Harrogate, UK

- 5) 榊原啓之、鈴木敦美、小林章男、本山径子、茶山和敏、下位香代子、社会的ストレスが誘導する内臓脂肪蓄積型肥満、第 6 4 回日本栄養・食糧学会大会、2010 年 5 月 21-23 日 (徳島)
- 6) 小島佳高、榊原啓之、小柳顯陽、松井朝子、林凌、鈴木浩子、菊池洋、半田久夫、木苗直秀、増田修一、下位香代子、社会的ストレス負荷が誘導する内臓脂肪蓄積に対するウコンの効果、第 6 4 回日本栄養・食糧学会大会、2010 年 5 月 21-23 日 (徳島)
- 7) 榊原啓之、下位香代子、オーガスト・ハーゲスハイマー、熊澤茂則、アサイーの機能性展望~抗酸化能から含有アントシアニンの吸収・代謝~、第 1 回アサイーフォーラム (アサイーの研究成果とオピニオンリーダーによるアサイーの活用と実践)、2010 年 7 月 23 日、ブラジル大使館 (東京)
- 8) 榊原啓之、小柳顯陽、鈴木敬明、鈴木敦美、林凌、下位香代子、時間栄養学的観点で実施する動物試験に向けてのプロトコル確立、第 15 回日本フードファクター学会学術集会、2010 年 10 月 4~5 日 (仙台)
- 9) Takahashi Y., Sakakibara H., Ojima Y., Kobayashi A., Shimoi K., Why does the blood cholesterol level increase in mice exposed to stressful housing environment? The 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences (3rd ICHALS), 2010/10/16, Shizuoka, Japan
- 10) 高橋豊、榊原啓之、小島佳高、下位香代子、長期間の環境・社会的ストレス負荷による血中コレステロール上昇機構の解明、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日 (神戸ポートアイランド)。
- 11) 青島良輝、榊原啓之、鈴木敬明、山崎隼輔、原のりこ、小柳顯陽、高林ふみ代、下位香代子、深夜の光曝露が血栓症の発症リスクを高める可能性、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア 2010、2010 年 12 月 15 日 (沼津)
- 12) 青島良輝、榊原啓之、鈴木敬明、山崎隼輔、原のりこ、小柳顯陽、高林ふみ代、下位香代子、暗期の光曝露により上昇する血栓症の発症リスクについて、平成 22 年度科学交流フォーラム (第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム)、2011 年 3 月 4 日 (静岡)
- 13) 青島良輝、榊原啓之、鈴木敬明、山崎隼輔、原のりこ、高林ふみ代、下位香代子、暗期の光曝露が時計遺伝子およびPai-1

遺伝子発現に与える影響、日本農芸化学
会 2011 年度大会、2011 年 3 月 25-28 日
(京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原啓之 (SAKAKIBARA HIROYUKI)

静岡県立大学・環境科学研究所・助教

研究者番号：20403701

(2) 研究協力者

下位香代子 (SHIMOI KAYOKO)

静岡県立大学・環境科学研究所・教授

研究者番号：10162728