

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688033

研究課題名(和文) 乳牛の栄養状態と潜在性疾病を検知する代謝性ホルモン感受性マーカーの探索

研究課題名(英文) CE-TOFMS-based metabolomics reveals effects of metabolic hormone in ruminant

研究代表者

杉野 利久 (SUGINO, TOSHIHISA)

広島大学・生物圏科学研究科・助教

研究者番号：90363035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000円

研究成果の概要(和文)：反芻動物においてGLP-1は、インスリンおよびグルカゴンを経さずに、血漿中のTG、総コレステロール、NEFA、乳酸およびケトン体濃度に影響し、血中において、GLP-1はインスリンと逆に作用した。また、肝臓および骨格筋のメタボローム解析によってGLP-1は、肝臓での解糖系・糖新生経路、ペントースリン酸経路、TCA回路、ピリミジン代謝、プリン代謝に関わる代謝物を増加させ、組織の代謝反応においてもGLP-1はインスリンと逆の作用を示す可能性が考えられた。以上の血漿および肝臓代謝物の結果から、反芻動物においてGLP-1は、グルカゴンを介さずに、インスリンが示す作用とは逆に作用することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to explore the role of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) in partitioning nutrient metabolism in ruminant, and to investigate whether or not this role is independent of its effects on insulin secretion. GLP-1 infusion increased NEFA, -hydroxybutyrate and TG, but decreased glucagon, T-Cho, NEAA, BCAA and UN plasma concentrations. And the results of metabolome analysis in liver and skeletal muscle revealed that GLP-1 infusion enhanced the gluconeogenic, lipolytic and ketogenic pathways and these pathways may be associated with decreased lipid clearance from the liver and skeletal muscle. In conclusion, GLP-1 exerts extrapancreatic roles in ruminants not only insulin-independent but probably, in contrast to non-ruminants, antagonistic to insulin effects.

研究分野：動物生産科学

キーワード：GLP-1 インスリン 反芻動物 骨格筋 肝臓 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

近年、乳牛の改良が進み、1頭当たりの平均乳量は著しく高くなっている。一方で、高泌乳牛の分娩後の摂取栄養量は泌乳に必要な量に追いつかず、個体を負のエネルギーバランス状態に追い込み、特に泌乳初期には栄養不足による脂肪肝やケトosisなどの代謝障害を誘発する。また、泌乳量の増加に伴い、繁殖障害を引き起こしている。その結果、淘汰年齢が早まり、平均産次数も低下してきている。このことは、遺伝的能力の改良に対応した飼養管理面の改善が不十分で、能力が十分に発現できていないことを示している。

これら諸問題を解決するには、適切な飼養管理法を開発し、泌乳持続性の推進、それに伴う身体的負担の軽減、生涯生産量の向上などを図らねばならない。

上記目的を達成するには、個体の栄養状態を的確に把握すること、および周産期疾病を予防することが必要不可欠となる。これまで、ボディコンディションスコア(BCS)などの外貌判定、血中の一般生化学成分を測定する代謝プロファイルテスト、給与飼料の成分や栄養価の把握などから、改善策が講じられてきてはいるが、個体間の泌乳能力の違いもあって、依然としての確かな栄養状態の把握および周産期疾病予防技術は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、周産期ホメオレシスの代謝調節に重要なインスリン・GH、および末梢性食欲調節因子であるGLP-1・グレリンに焦点を絞り血中メタボロミクス解析を行い、栄養代謝調節因子である代謝性ホルモンの感受性をバイオマーカーで検知することによって、乳牛の栄養状態や潜在性疾病を的確かつ簡易的に把握することを目的とし、(1)代謝性ホルモンの感受性マーカーの探索に必要なとなる乳牛の栄養状態と血漿代謝産物との関係、および周産期での網羅的な血漿代謝産物の変動解析、(2)周産期疾病で重要な臓器である肝臓におけるグレリンとGLP-1の代謝産物に及ぼす影響、(3)GLP-1作用の反芻動物特異性の解析を実施した。

3. 研究の方法

(1)周産期乳牛における網羅的血漿代謝産物の変動解析と栄養状態との関係

試験には、305日乳量が10,000kgを超える乳牛を用い、乾乳期間を60日とし、前期(40日)と後期(20日)に分けて、乾乳前期の栄養水準を要求量に基づき130%区(高栄養区)および80%区(低栄養区)の2処理区を設け、各処理区は3頭になるように供試牛を配置した。乾乳後期は全ての処理区において要求量の100%とした。採血は、乾乳前期最終日および分娩後1週目、10週目に実施した。血漿中メタボローム解析はキャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)を用

いて実施した。

(2)ホルスタイン種去勢牛の肝臓におけるグレリンとGLP-1作用の解明

試験には、ホルスタイン種去勢牛3頭(平均体重400kg)を用いた。試験は、頸静脈より生理食塩水を投与する対照区、 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ のグレリンを投与するグレリン区、および同容量のGLP-1を投与するGLP-1区の計3処理区を設け、 3×3 ラテン方格法で実施した。各溶液投与後30分に、採血および生検針を用いて肝臓組織片を採取し、メタボローム解析を行った。メタボローム解析はCE-TOFMSを用いて実施した。

(3)ヒツジ肝臓におけるGLP-1作用の解析

試験にはサフォーク種去勢ヒツジ4頭($\text{BW}: 60.0\pm 6.7\text{kg}$)を用い、ユーグリセミッククランプを実施した。インスリン注入開始時を0分とし、注入開始60分後にGLP-1注入を開始した。GLP-1注入開始30分後にインスリン注入を止め、その後60分間はGLP-1のみを注入した。血糖値維持のために20%グルコース溶液を可変的に注入した。肝バイオプシーは、インスリン注入開始から0分(対照)、60分後(インスリン)、GLP-1注入開始30分後(インスリン+GLP-1)、90分後(GLP-1)の計4回実施し、肝臓組織片を採取した。得られた肝臓組織片採取をCE-TOFMSを用いたメタボローム解析に供した。

(4)ヒツジ骨格筋におけるGLP-1作用の解析

試験には、サフォーク種去勢羊4頭($\text{BW}: 45.0\pm 7.8\text{kg}$)を用いた。処理区として、生理食塩水を頸静脈より90分間注入する対照区、GLP-1($0.5\mu\text{g}/\text{kgBW}$)を連続注入するGLP-1区、インスリン($0.5\text{IU}/\text{kgBW}$)を注入するインスリン区および混合注入区を設け、 4×4 ラテン方格法で実施した。また、試験を通してグルコース溶液を注入し、正常血糖を維持した。注入90分後に骨格筋組織片の採取、また、経時的に採血を実施し、骨格筋でのGLP-1による代謝変化をCE-TOFMSを用いたメタボローム解析により解析した。

4. 研究成果

(1)周産期乳牛における網羅的血漿代謝産物の変動解析と栄養状態との関係(学会発表～)

メタボローム解析の結果、154のピークが検出され、これらピークをHMT代謝物質データベース(HTM DB)と照合し代謝物質を特定した。

これら154物質の相対面積値を標準化し、それに基づきクラスター解析を実施、周産期で変動しているクラスターを選抜した。それにより91の代謝物質を選抜した。選抜後、主成分解析を行った結果、第1主成分得点の寄与率は52.5%、第2主成分得点は寄与率23%であった。因子負荷量から、周産期の代謝変動および栄養状態を反映するバイオマーカーを35物質選抜した(表1)。選抜され

た物質の多くは、メチル基転移代謝に関連した物質であった。選抜した代謝産物は、周産期の栄養状態のバイオマーカーとして利用可能であると考えられるが、代謝ホルモンとの関連性は弱く、ホルモンのバイオマーカーとしては、詳細な検討が必要であると考えられた。

表 1. 選抜した代謝産物の因子負荷量

代謝物質	因子負荷量
1 Betaine	-0.97058
2 Triethanolamine	-0.96106
3 SDMA	-0.95725
4 4-Methyl-2-oxovaleric acid	-0.94355
5 No-Methylarginine	-0.94294
6 Glu	-0.93962
7 Sarcosine	-0.90398
8 Creatinine	-0.89877
9 5-Hydroxylysine	-0.89644
10 N-Acetylglucosamine	-0.889
11 Homocitrulline	-0.87859
12 Gln	-0.87169
13 Azelaic acid	-0.86393
14 N,N-Dimethylglycine	-0.80352
15 S-Methylmethionine	0.81756
16 3-Ureidopropionic acid	0.81828
17 Trimethylamine N-oxide	0.82966
18 Uridine	0.84137
19 Carboxymethyllysine	0.85443
20 S-Methylcysteine	0.85988
21 Allantoin	0.86831
22 3-Aminopropane-1,2-diol	0.87673
23 Aan	0.88035
24 Glutaric acid	0.88968
25 Butyric acid	0.90111
26 Valeric acid	0.90581
27 2-Hydroxyvaleric acid	0.90839
28 3-Phenylpropionic acid	0.91238
29 o-Hydroxybenzoic acid	0.91467
30 Pepsicolic acid	0.94291
31 2,6-Diaminopimelic acid	0.94318
32 Pro	0.94428
33 Nicotinamide	0.9645
34 1-Methyl-4-imidazoleacetic acid	0.96684
35 4-Pyridoxic acid	0.98255

(2) ホルスタイン種去勢牛の肝臓におけるグレリンと GLP-1 作用の解明 (雑誌論文, 学会発表)

試験(1)の結果から、代謝ホルモンと関連のある代謝産物のスクリーニングが困難だったため、試験(2)では、去勢牛を供試して、GLP-1 およびグレリンの感作試験を実施した。その結果、GLP-1 およびグレリンの血漿濃度は、投与 30 分後に対照区と比較して高値を維持していたが、血漿インスリンおよび GH 濃度には対照区との違いはなかった。肝臓での代謝産物については、対照区と比較して GLP-1 投与区で 20 産物(表 2)、グレリン投与区で 10 産物(表 3)に変化が認められた ($P < 0.05$)。これら肝臓での代謝産物の変化から、GLP-1 は糖新生、脂質合成および尿素合成を増加させ、グレリンは糖新生および蛋白代謝回転を増加させる可能性が示された。以上の結果から、反芻動物の肝臓糖代謝において、GLP-1 とグレリンは類似した作用を示す可能性が考えられた。単胃動物の GLP-1 作用は、インスリンと類似しているこ

とが報告されている。本試験結果は、単胃動物での作用とは異なり、抗インスリン作用を示すものであった。この反芻動物特異的と考えられる GLP-1 の抗インスリン作用は、国内外を通して同様の報告がなく、本試験で初めて明らかにした作用である。

表 2. GLP-1 投与により変動した肝臓代謝産物 (対照区との比)

Relative change	Metabolites	Ratio	P-value
Increased			
	Octanoic acid	1.2	0.049
	2-Aminoadipic acid	1.1	0.032
	Homoserinelactone	1.2	0.003
	ADP	2.9	0.027
Decreased			
	N5-Ethylglutamine	0.7	0.050
	Ethanolamine	0.7	0.011
	Cysteine glutathione disulfide	0.3	0.017
	Choline	0.8	0.040
	Ala	0.9	0.045
	Glu	0.9	0.017
	Imidazole-4-acetic acid	0.4	0.005
	S-Adenosylhomocysteine	0.7	0.014
	N-Acetylglucosylamine	0.9	0.038
	Cytidine	0.7	0.038
	Xanthine	0.3	0.009
	Lactic acid	0.5	0.001
	6-Phosphogluconic acid	0.4	0.029
	Glyceric acid	0.7	0.032
	Threonic acid	0.8	0.026
	Pyridoxamine 5'-phosphate	0.7	0.040

表 3. グレリン投与により変動した肝臓代謝産物 (対照区との比)

Relative change	Metabolites	Ratio	P-value
Increased			
	N,N-Dimethylglycine	1.3	0.006
	Thr	1.1	0.001
	Homoserinelactone	1.2	0.040
	Urocanic acid	1.1	0.021
Decreased			
	N-Methylproline	0.6	0.019
	Isopropanolamine	0.8	0.032
	Cytidine	0.8	0.019
	Uridine	0.8	0.003
	ADP	0.9	0.033
	myo-Inositol 2-phosphate	0.7	0.018

(3) ヒツジ肝臓における GLP-1 作用の解析 (雑誌論文, 学会発表)

試験(2)の結果、GLP-1 作用は、反芻動物特異的に、抗インスリン作用を有する可能性が示された。しかしながら、GLP-1 はインスリン分泌促進作用を有するため、試験(2)の結果が、GLP-1 の直接的作用であるかどうかを精査する必要があると考えられた。そこで、試験(3)では、ヒツジを用いて、ユーグリセミッククランプ試験を併用して、GLP-1 の直接的な肝臓における作用をメタボロミクス解析で検討した。また、血液性状への影響も検討した。

その結果、血漿インスリン濃度はインスリン注入開始後徐々に増加し、GLP-1 注入開始後さらに増加したが、インスリン注入終了後徐々に基礎値に戻った。血漿 GLP-1 濃度は

GLP-1 注入開始後増加し、高値で推移した。血漿アミノ酸濃度は、グルタミン酸がインスリン注入開始後減少し、GLP-1 注入開始後増加した。また、ロイシンが GLP-1 注入のみで増加した。血漿 TG 濃度はインスリン注入開始後増加し、GLP-1 注入開始後さらに増加したが、インスリン注入終了後減少した。血漿総コレステロール濃度は GLP-1 注入開始後徐々に減少し、インスリン注入終了後さらに減少した。血漿 NEFA、乳酸およびケトン体濃度はインスリン注入開始後減少したが、GLP-1 注入開始後徐々に増加し、インスリン注入終了後さらに増加した(図1)。また、血漿グルカゴン濃度はインスリン注入開始後減少し、GLP-1 注入後も低値で推移した。血中において、GLP-1 はインスリンと逆に作用

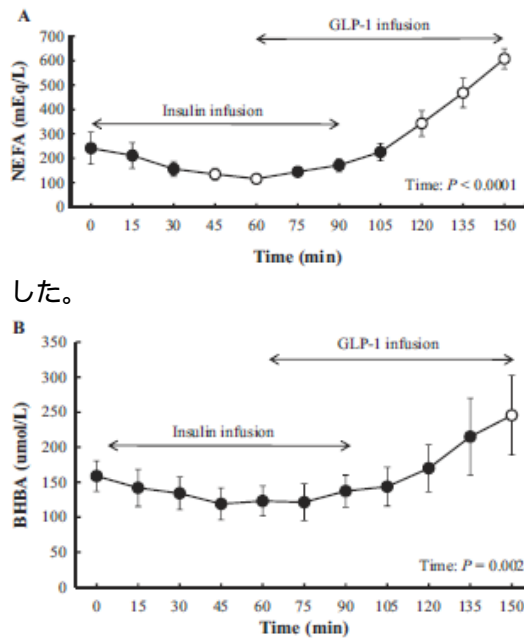


図1. インスリンおよび GLP-1 が血漿 NEFA (A) およびケトン体 (B) 濃度に及ぼす影響
○ : 0 分と比較して有意差有り

肝臓メタボローム解析によって代謝産物は 246 物質検出され、直交部分最小二乗法 (OPLS-DA) を用い、因子負荷量 0.8 以上の代謝産物 38 物質を選抜した。肝臓での解糖系・糖新生経路、ペントースリン酸経路(図2)、TCA 回路(図3)、ピリミジン代謝、プリン代謝に関わる代謝物およびグルタミン酸はインスリン注入により減少したが、GLP-1 注入後増加した。GLP-1 の注入はプロリン、分岐鎖アミノ酸、BHBA、リジン代謝産物およびメチオニン代謝産物を増加させたが、インスリンの注入による影響は見られなかった。肝臓の代謝反応においても GLP-1 はインスリンと逆の作用を示す可能性が考えられた。

血漿および肝臓代謝物の結果から、反芻動物において GLP-1 は、グルカゴンを介さず、インスリンが示す作用とは逆に作用することが示唆された。

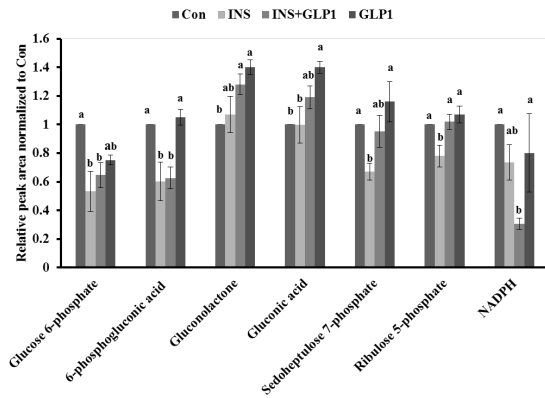


図2. インスリンおよび GLP-1 が肝臓ペントースリン酸経路に及ぼす影響

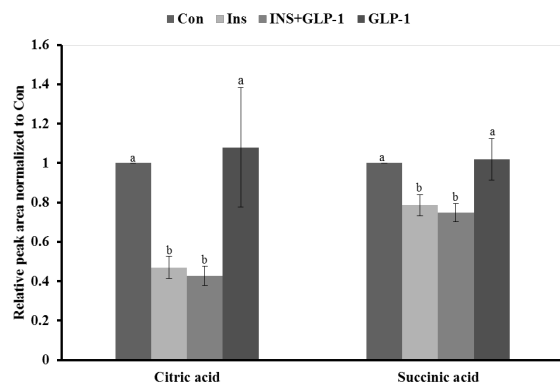


図3. インスリンおよび GLP-1 が肝臓 TCA 回路に及ぼす影響

(4) ヒツジ骨格筋における GLP-1 作用の解析

試験(2)および試験(3)の結果、GLP-1 は反芻動物の肝臓において、抗インスリン作用を発現していることが示された。また、その肝臓での作用を反映して、血漿生化学成分値も同様の变化を示した。これら試験で明らかとなった GLP-1 の肝臓での抗インスリン作用が、組織特異性であるかを検討するために、本試験では骨格筋における GLP-1 の作用をメタボローム解析により検討した。

結果、血漿インスリン濃度は、インスリン区で高濃度を維持した。また、GLP-1 および混合区で注入開始後、血漿インスリン濃度の一過性の増加が認められたが、注入 90 分後には基礎値まで減少していた。メタボローム解析の結果、処理区間で差が認められた代謝産物は 16 であった。肝臓での結果と同様に、骨格筋においても、GLP-1 はインスリンとは逆の作用を糖代謝およびアミノ酸代謝で示し、解糖系や TCA 回路の抑制、アミノ酸の異化促進を示す傾向にあった。

(5) 結語

本研究結果から、乳牛の周産期において、血中メタボロームは、栄養水準の影響を受けること、また、泌乳によるホメオレシスによ

り変化することが明らかとなったが、目的である代謝ホルモンのバイオマーカーの検出には至らなかった。しかしながら、ホルモン感作試験による肝臓および骨格筋のメタボローム解析により、単胃動物においてインスリン類似作用を示すGLP-1が、反芻動物では、抗インスリン作用を示すことが明らかとなった。また、これら組織でのメタボローム変化を反映して、血液性状も変化していたことから、今後は、GLP-1作用に関連する酵素の遺伝子発現および酵素活性など詳細な機序を検討し、また血中メタボローム解析も実施し、ホルモンの組織代謝を反映するバイオマーカーの探索を実施する予定である。

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16件)

EL-Sabagh M, Taniguchi D, Sugino T, Obitsu T, Taniguchi K. Insulin-independent actions of glucagon-like peptide-1 in wethers. *Animal Science Journal*, 査読有, 86, 2015, 385-391.
DOI:10.1111/asj.12306.

El-Sabagh M, Taniguchi D, Sugino T, Obitsu T, Taniguchi K. Effect of glucagon-like peptide-1 and ghrelin on liver metabolites in steers. *Animal Production Science*, 査読有, 54, 2014, 1732-1736.
DOI:10.1071/AN14363

Sugino T, Tateno A, Ueno G, Kawashima K, Okimura T, Hirabayashi H, Suzuki A, Asakuma S, Kobayashi H, Isobe N, Obitsu T, Kushibiki S. Effects of calcium salts of medium-chain fatty acids on plasma metabolite and hormone concentrations in early lactating dairy cows. *Animal Production Science*, 査読有, 54, 2014, 1699-1702.
DOI: 10.1071/AN14233

Fukumori R, Sugino T, Shingu H, Moriya N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Kushibiki S, Taniguchi K. Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin. *Domestic Animal Endocrinology*, 査読有, 45, 2013, 216-223.
DOI:10.1016/j.domaniend.2013.09.005

Fukumori R, Mita T, Sugino T, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Taniguchi K. Effects of intravenous ghrelin injection on plasma growth hormone, insulin, and glucose concentrations in calves at weaning. *Animal Science Journal*, 査読有, 84, 2013, 310-315.

DOI:10.1111/asj.12001

福森理加, 杉野利久, 小櫃剛人, 谷口幸三. 泌乳牛における栄養素と血漿グレリン濃度の関係について. *栄養生理研究会報*, 査読有, 57, 2013, 33-44.

Fukumori R, Mita T, Sugino T, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Taniguchi K. Effects of glucose and volatile fatty acids on blood ghrelin concentrations in calves before and after weaning. *Journal of Animal Science*, 査読有, 90, 2012, 4839-4845.
DOI:10.2527/jas.2012-5344

Fukumori R, Mita T, Sugino T, Obitsu T, Taniguchi K. Plasma concentrations and effects of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in calves before and after weaning. *Domestic Animal Endocrinology*, 査読有, 43, 2012, 299-306.
DOI:10.1016/j.domaniend.2012.05.003

Laarman AH, Sugino T, Oba M. Effects of starch content of calf starter on growth and rumen pH in Holstein calves during the weaning transition. *Journal of Dairy Science*, 査読有, 95, 2012, 4478-4487.
DOI:10.3168/jds.2011-4822

Laarman AH, Ruiz-Sanchez AL, Sugino T, Guan LL, Oba M. Effects of feeding a calf starter on molecular adaptations in the ruminal epithelium and liver of Holstein dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 査読有, 95, 2012, 2585-2594.
DOI:10.3168/jds.2011-4788

Fukumori R, Sugino T, Shingu H, Moriya N, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Kushibiki S, Taniguchi K. Effects of calcium salts of long-chain fatty acids and rumen-protected methionine on plasma concentrations of ghrelin, glucagon-like peptide-1 (7 to 36) amide and pancreatic hormones in lactating cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 査読有, 42, 2012, 74-82.
DOI:10.1016/j.domaniend.2011.09.005

[学会発表](計41件)

杉野利久. 去勢牛の肝臓メタボロームに及ぼすGLP-1とグレリンの影響. 日本畜産学会第119回大会, 2015年3月28日, 栃木県宇都宮市.

Sugino T. Effect of lactose and casein on plasma glucagon-like peptide-1 (7-36) amide concentrations in calves before weaning. 16th Asian-Australasian Animal Production Congress, 2014年11月10日, Yogyakarta, Indonesia.

Taniguchi D. Effects of insulin and GLP-1 on plasma metabolites in wethers. Joint International Symposium on Nutrition of Herbivores / International Symposium on

Ruminant Physiology, 2014 年 9 月 8 日,
Canberra, Australia.

石掛以果．高ケトン体ヒツジへのグルタミン酸注入がインスリン反応性に及ぼす影響．日本畜産学会第 118 回大会，2014 年 3 月 28 日，茨城県つくば市．

谷口 大．ヒツジの肝臓における GLP-1 作用のメタボロミクスによる検討．日本畜産学会第 118 回大会，2014 年 3 月 28 日，茨城県つくば市．

杉野利久．乾乳後期の栄養処理が高泌乳牛の血液性状と乳生産に及ぼす影響．日本畜産学会第 118 回大会，2014 年 3 月 27 日，茨城県つくば市．

杉野利久．中鎖脂肪酸 Ca の補給が高泌乳牛の血液正常と乳生産に及ぼす影響．日本畜産学会第 117 回大会，2013 年 9 月 9 日，新潟県新潟市．

杉野利久．乾乳前期の栄養水準が高泌乳牛の血液性状に及ぼす影響．日本畜産学会第 116 回大会，2013 年 3 月 28 日，広島県広島市．

杉野利久．泌乳牛への中鎖脂肪酸 Ca 補給が血中消化管ホルモン濃度に及ぼす影響．第 62 回関西畜産学会，2012 年 9 月 14 日，和歌山県和歌山市．

6．研究組織

(1)研究代表者

杉野 利久 (SUGINO TOSHIHISA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教
研究者番号：90363035