

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591329

研究課題名(和文)肥満脂肪組織における酸化ストレス亢進とグルタチオン蓄積病態の解明

研究課題名(英文)Oxidative stress and glutathione accumulation in adipose tissues of obese mice

研究代表者

福原 淳範 (Fukuhara, Atsunori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00437328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：catalaseとSODを脂肪組織に過剰発現するトランスジェニックマウスを交配し、両者を過剰発現するマウス(DTgマウス)を作出した。高脂肪高ショ糖食負荷を行うと、体重は有意に高値である一方で糖負荷テスト、インスリン負荷テストは改善していた。肝重量は有意に低下しており、脂肪組織重量は増加した。この時、肝臓での中性脂肪蓄積は低下しており、脂肪肝の改善が認められた。本マウスではインスリン感受性が改善することで脂肪組織への中性脂肪蓄積が増加し、肝臓への蓄積が低下した。グルタチオン合成酵素であるgamma-GCS-floxマウスと脂肪組織特異的なadiponectin-Creマウスの交配をおこなった。

研究成果の概要(英文)：We created double-transgenic mice with adipose-specific overexpression of both catalase and SOD1 (DTg mice). When DTg mice were fed high-fat/high-sucrose diet, DTg mice gained weight more than control mice. Both glucose tolerance and insulin sensitivity were improved in DTg mice compared with control mice. DTg mice showed significantly more adipose tissue weight despite of lesser liver weight and body weight than control mice. Triglyceride amount was reduced in liver of DTg mice compared with control mice. These results indicated that overexpression of antioxidative enzyme resulted in improvement of oxidative stress, followed by amelioration of insulin sensitivity and enhancement of triglyceride accumulation in adipose tissues. Glutathione synthesis enzyme (gamma-GCS) floxed mice were crossed with adiponectin-Cre mice, to generate adipose-specific glutathione deletion mice.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：酸化ストレス 抗酸化酵素 カタラーゼ SOD グルタチオン

## 1. 研究開始当初の背景

肥満脂肪組織の病態解明が進み、脂肪組織が様々なストレスに曝露されていることが明らかになった。特に、炎症細胞の浸潤と小胞体ストレスは肥満病態の形成に重要な役割を果たしている。私共は、肥満状態の脂肪組織が灌流不全による低酸素状態となっており、これが小胞体ストレスを惹起することで、アディポネクチンの産生低下を引き起こすことを世界に先駆けて報告した(Hosogai, Fukuhara, Shimomura et al. Diabetes 56:901, 2007)。申請者らの教室では肥満早期より血中酸化ストレス指標が上昇し、脂肪組織がその産生源となっていることを見出し、Fat ROS (脂肪組織酸化ストレス)概念を提唱した(Shimomura et al. JCI 114:1752,2004)。肥満脂肪組織で産生される活性酸素は、アディポネクチンを低下させ、炎症性サイトカインの発現量を増加させる。症例解析によって、内臓脂肪蓄積が、全身の酸化ストレス産生の規定因子であること、脂肪組織由来の酸化ストレスの制御には脂肪組織中のミネラルコルチコイド受容体やAngiotensinII が密接に関わることを、申請者らのグループが報告している(Shimomura et.al Cardiovasc Res, 84, 2009)

肥満脂肪組織で生じる酸化ストレス状態の原因としては、NADPHoxidase の発現量が増加することに起因する活性酸素産生量の増加であることを申請者らのグループは見出した(Shimomura et al. JCI 114:1752,2004)。一方で、活性酸素を除去するCatalase、SOD1の抗酸化酵素の遺伝子発現ならびに活性は低下している。抗酸化酵素の発現低下はマウスに高脂肪食投与後一か月以内の早期に出現する現象である。したがって、抗酸化酵素の発現異常そのものが、酸化ストレスの発症原因であり、この制御異常を是正することで、肥満病態の改善効果が期待される。

申請者は、脂肪組織ではグルタチオン量が肥満初期から著明に増加すること、グルタチオンのde novo合成酵素γ-GCSが慢性的に上昇していることを見出した。さらに、培養脂肪細胞にグルタチオンを添加すると、インスリン抵抗性が強く誘導されることを見出した(Kobayashi, Fukuhara, Shimomura et al. Am J Physiol 296:E1326, 2009)。したがって、グルタチオンの過剰蓄積が、肥満病態を悪化させる因子であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、脂肪組織の慢性炎症状態と酸化ストレス状態の概念を発展させ、病態の上流因子として抗酸化酵素およびグルタチオンの重要性を明らかにする。具体的には(1) catalaseおよびSOD1を脂肪組織特異的に過剰発現することで、肥満病態の改善および治療につながることを明らかにする。(2) グルタチオンの異常蓄積が脂肪組織の病態に関与し、グルタチオン合成を阻害することで病態が改善することをマウスおよび培養細胞を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

肥満脂肪組織で発現量と活性が低下する抗酸化酵素である catalase と SOD1 に注目した。肥満状態では活性酸素は脂肪組織特異的に産生が増加することから、これを除去する目的で、αP2 プロモータを利用した脂肪組織特異的 catalase トランスジェニックマウスと SOD1 トランスジェニックマウスを作成した。これらのトランスジェニックマウスに対して、高脂肪食負荷を行い、全身の糖脂質代謝改善作用を解析した。

脂肪組織のグルタチオンが肥満脂肪組織の病態に果たす役割を明らかにするために、脂肪組織特異的グルタチオン合成酵素欠損マウスを作成した。また、培養脂肪細胞を用い

てグルタチオン添加、グルタチオン合成酵素の過剰発現を行い、インスリン抵抗性発症機序について解析を行った。

#### 4. 研究成果

(I) 脂肪組織特異的酸化ストレス除去モデルとして、catalase と SOD を脂肪組織に過剰発現するトランスジェニックマウスを交配し、両者を過剰発現するマウス (DTg マウス) を作出し、解析を行った。酸化ストレス指標としてイソプロスタンを脂肪組織で測定したところ、DTg マウスでは有意に低下しており、脂肪組織特異的酸化ストレス解除モデルとして機能していた。本マウスに高脂肪高シヨ糖食負荷を行うと、体重は有意に高値であった。一方で糖負荷テスト、インスリン負荷テストの結果は、対照マウスと比較して改善していた。マウスの組織重量を測定したところ、肝重量は有意に低下しており、脂肪組織重量は増加していた。この時、肝臓での中性脂肪蓄積は低下しており、脂肪肝の改善が認められた。すなわち、本マウスではインスリン感受性の改善に伴い、脂肪組織への中性脂肪蓄積が増加し、肝臓への中性脂肪蓄積が低下していた。以上のことから、抗酸化酵素を過剰発現し、脂肪組織の酸化ストレス状態を解除することで、肥満病態が改善することが示された。

(II) 培養 3T3-L1 脂肪細胞において、グルタチオンの添加によって、インスリン誘導性の Akt リン酸化が減弱することを見出した。そこで、ドキシサイクリン誘導性にグルタチオン合成酵素を過剰発現する 3T3-L1 脂肪細胞を作製した。本細胞では細胞内グルタチオン量が増加しており、インスリン誘導性の Akt リン酸化が減弱していた。したがって、外因性と内因性の両者のグルタチオンがインスリン抵抗性を惹起することを見出した。そこで、脂肪組織特異的にグルタチオン合成が低下するマウス作製した。グルタチオン合成酵

素である gamma-GCS-flox マウスと脂肪組織特異的な adiponectin-Cre マウスの交配をおこない、マウスを作成した。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 9 回メタボリックシンドローム研究会

平成 25 年 1 月 19 日 東京

脂肪組織特異的酸化ストレス除去マウスの作製と解析 福原淳範、橋本恵里香、宮田佑吾、小林祥子、大月道夫、下村伊一郎

第 57 回 日本糖尿病学会年次学術集会

2014 年 5 月 23、大阪】

奥野陽亮、福原淳範、大月道夫、下村伊一郎：  
脂肪細胞におけるグルタチオン合成酵素の作用解析

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

福原 淳範 (FUKUHARA Atsunori)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00437328

### (2)研究分担者

下村 伊一郎 (SHIMOMURA Ichiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60346145

大月 道夫 (OTSUKI Michio)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00403056

### (3)連携研究者

なし