

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780118

研究課題名(和文)メタボリック症候群発症に関わる腸間膜脂肪細胞の機能解析と食品成分によるその制御

研究課題名(英文)Omics analysis of mesenteric fat tissues to determine the site specific function of adipocyte

研究代表者

篠木 亜季 (Shinoki, Aki)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60589208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの発症に関わる内臓脂肪の腸間膜脂肪を小腸側と大腸側に分け、その機能的な違いに着目した研究はこれまでにほとんどない。この部位に差異をもたらす要因を究明するために、網羅的比較解析を実施した。本研究課題では小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞において著しく異なる発現分子の存在を明らかにした。さらに、この発現分子を介した脂肪細胞の生理機能の違いが示唆された。これらの結果は、小腸側と大腸側で腸間膜静脈に吸収される栄養素等の違いが、それぞれの部位によって腸間膜脂肪細胞の機能に影響を与えることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have investigated the differences between small and large intestinal mesenteric adipose tissues associated with metabolic syndrome in rats. There were the differences of some factors between the small and large intestinal fat tissues. The luminal environment might determine the function of mesenteric adipose tissues in each site. These results suggest that the differences between the small and large intestinal mesenteric fat tissues are responsible for the site specific function of adipocyte.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸間膜脂肪細胞 メタボリックシンドローム プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満を発症の主因とし、日本を含めた世界中で社会問題となっている。この内臓脂肪型肥満は、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧症などを引き起こす。その機序として、肥大した脂肪細胞、特に腸間膜脂肪細胞から分泌される種々の生理活性物質、アディポサイトカイン (Tumor necrosis factor : TNF- $\alpha$ 、Monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1、Plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1、レプチンなど) 分泌の異常とともに、遊離脂肪酸 (Non-esterified fatty acid: NEFA) の過剰な分泌が挙げられる。これらのアディポサイトカインの分泌異常は直接的或いは間接的にインスリンシグナル伝達を阻害し、NEFA 産生の増大は抹消組織のグルコース利用や膵細胞のインスリン分泌を直接阻害することで、メタボリックシンドローム発症に関与する。

内臓脂肪である腸間膜脂肪は、小腸側と大腸側で異なる腸間膜静脈に接するため、吸収される栄養素や物質の違いが腸間膜脂肪細胞の機能に影響する可能性が考えられる。小腸では、アミノ酸や脂質、可溶性糖質が吸収され、大腸では、細菌成分やその代謝物、難消化性糖質の発酵によって得られた短鎖脂肪酸などの有機酸が吸収される。また、腸内細菌叢が肥満および糖尿病などの疾患に関与していることが近年報告されている。

近年我々は、門脈を境に腸間膜脂肪組織を小腸側と大腸側に分け、それぞれから脂肪細胞を分離し、アドレナリン刺激下における脂肪細胞の脂肪分解を比較した。その結果、腸間膜脂肪細胞の NEFA 分泌が、小腸側より大腸側で高いことを見出した。これは、小腸側と大腸側で腸間膜静脈に吸収される栄養素や物質の違いが、それぞれの部位の腸間膜脂肪細胞の機能に影響を与えることを示唆している。

また、大腸側腸間膜脂肪細胞の高い NEFA 分泌能はメタボリックシンドローム発症のリスクに寄与すると推定される。そこで、これらの腸間膜脂肪細胞の機能の差異を明らかにする必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、腸間膜脂肪細胞の小腸側および大腸側における差異をもたらず分子を明らかにすることに加え、小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞にどのような違いがあるのかを細胞機能および分子レベルにおいて詳細に解析し、それらの差異がメタボリックシンドローム発症に関与するかどうかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ・実験動物

3週齢のSprague-Dawley (SD) 系、雄性ラット (日本クレア株式会社) を基本飼料である糖源をショ糖にしたAIN-93G 準拠の半精製飼料を用いて5週間飼育した。腸間膜脂肪組織、副睾丸周囲脂肪組織、および後腹膜脂肪組織を摘出し、腸間膜脂肪組織は摘出後、直ちに門脈を境に小腸側と大腸側に分けてそれぞれの試験に用いた。

全ての試験は国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を得た上で、北海道大学動物実験に関する規程に基づき実施した。

### ・単離脂肪細胞の調製

単離脂肪細胞はRodbellらの方法に従って調製した。ラットから摘出した脂肪組織は、直ちにはさみで小さく切り、コラゲナーゼの入った分離用メディウム [Krebs-Ringer-bicarbonate buffer, pH 7.4; 118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 2.7 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.9 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 4% (w/v) ウシ血清アルブミン, 0.1% (w/v) コラゲナーゼ, 0.01% (w/v) トリプシンインヒビター, 2.5 mmol/L グルコース] に入れて、1時間、37 °C、振とう70 rpmでインキュベートした。

脂肪組織は消化後、1,000  $\mu$ m のナイロンメッシュにより未消化組織を除いた。一定時間の静置後、分化して脂肪を蓄積した脂肪細胞はメディウム上層に浮き、脂肪を蓄積していない未分化前駆脂肪細胞、線維芽細胞等の間質細胞や毛細血管等は沈殿し、界面が明瞭に分かれた。下層のコラゲナーゼを含む分離用メディウムを除去し、コラゲナーゼを含まないメディウムで洗浄を2回繰り返し、コラゲナーゼを十分除去した。この操作によって上層の分化した脂肪細胞のみを分離し、得られた単離脂肪細胞は試験に用いた。

### ・単離脂肪細胞の脂肪分解の測定

本研究課題では、脂肪細胞に蓄積した中性脂質が脂肪分解 (リポリシス) により産生した遊離脂肪酸 (NEFA) をリポリシスの指標とした。

調製した単離脂肪細胞はメディウムで3倍に希釈し、150  $\mu$ L を試験に用い、刺激用メディウム [Krebs-Ringer-phosphate buffer, pH 7.4; 122 mmol/L NaCl, 4.9 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 16.7 mmol/L phosphate buffer, 3% (w/v) ウシ血清アルブミン, 5 mmol/L グルコース] 750  $\mu$ L に入れて、各濃度のアドレナリン 100  $\mu$ L を添加後、1時間、37 °C、振とう70 rpmでインキュベートした。アドレナリン濃度は、最終濃度が0、0.25、0.5、1.0、2.0および3.0  $\mu$ g/mL になるように添加した。1時間後、直ちに氷冷し反応を停止し、メディウム中に分泌された NEFA 濃度およびアディポサイトカイン濃度を市販

の測定キットまたは ELISA キットを用いて測定した。

#### ・DNA マイクロアレイ解析

脂肪細胞に存在し、脂肪の合成と分解に関わる因子およびそのシグナル伝達経路、さらに、脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌に関して小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞にどのような違いがあるのかを分子レベルにおいて詳細に解析するために DNA マイクロアレイ解析を用いて比較した。

ラットから抽出した小腸側と大腸側の腸間膜脂肪組織から RNeasy mini kit (QUIAGEN) を使用して Total RNA を抽出後、3D-Gene<sup>®</sup>全遺伝子型 DNA チップ (TORAY Innovation by Chemistry) を用いて解析した。

#### ・プロテオミクス解析

腸間膜脂肪細胞の小腸側および大腸側における差異をもたらす因子をさらに詳細に解析するために、発現しているタンパク質の網羅的比較を行った。

本研究課題では、小腸側と大腸側の腸間膜脂肪組織中にある多数のタンパク質を効率よく解析するために、スクリプス研究所の John Yates らが開発した多次元クロマトグラフィーとタンデム型質量分析装置とを組み合わせたショットガン分析用二次元キャピラリー LC-MS-MS システム (Multi-dimensional Protein Identification Technology; MudPIT) を利用したプロテオミクス解析を用いた。

MudPIT では、タンパク質の同定効率を高めるために、マイクロキャピラリーカラムに強カチオン交換樹脂の SCX と逆相樹脂の C18 を充填したものを用いた。このカラムに試料をロードし、SCX カラムに吸着した試料は塩濃度勾配により逆相カラムへ溶離させ、この逆相カラムから直接 MS へ導入し解析した。この2段階のクロマトグラフィーによって、二次元電気泳動法に比べ、高精度に多種多様のタンパク質を解析することが可能であった。この解析から得られたデータはタンパク質データベースと照合して同定した。

#### ・タンパク質の抽出

ラットから抽出した小腸側と大腸側の腸間膜脂肪組織からプロテオミクス解析で用いるタンパク質を抽出するために抽出方法を検討した。

脂肪組織から脂質画分を除去した後、タンパク質画分を変性させ、市販のタンパク質抽出バッファーを用いてタンパク質を抽出後、トリクロロ酢酸にてタンパク質を沈殿させた。その後、トリプシンなどのプロテアーゼによりタンパク質を消化し、ペプチド混合物は酸性化後、試料として分析に用いた。

## 4. 研究成果

腸間膜脂肪組織を含めた内臓脂肪組織間における脂肪細胞の機能の差異を検討するために、腸間膜脂肪組織の小腸側と大腸側、副睾丸周囲脂肪組織、および後腹膜脂肪組織を用いた。それぞれの脂肪組織を分離し、脂肪分解促進因子の一つであるアドレナリンを刺激因子として用い、単離脂肪細胞における生理的応答の違いを比較した結果、NEFAの分泌は腸間膜脂肪細胞の大腸側で最も高いことが示された。この時、アドレナリンとは異なる脂肪分解促進因子のカテコールアミンやグルカゴンなどを用いて腸間膜脂肪細胞に対する生理的応答への影響を調べたところ、いくつかの刺激因子が脂肪細胞からのNEFAの分泌を促進することが示された。また、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの変動を小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞において検討した。これらの結果から、脂肪細胞の生理的応答は脂肪の部位および刺激因子に影響を受けること、また、腸間膜脂肪組織の小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞において機能的な違いが示唆された。

小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞の機能の差異をもたらす因子について詳細に解析するために、ラットより採取した小腸側と大腸側の腸間膜脂肪組織を用い、DNA マイクロアレイによる網羅的比較を行った。小腸側と大腸側において炎症性サイトカインおよび転写因子の発現に違いがあることを見出した。

上記の DNA マイクロアレイより見出された因子が小腸側および大腸側脂肪細胞の機能的差異に与える影響を詳細に検証するために、プロテオミクス解析を用いて小腸側および大腸側腸間膜脂肪細胞におけるタンパク質発現を網羅的に解析した。解析から得られたデータをタンパク質データベースと照合して同定したところ、小腸側または大腸側腸間膜脂肪細胞にのみ単独で発現しているタンパク質および小腸側と大腸側に共通して発現しているタンパク質を特定した。また、同定したタンパク質の種類は、単独で発現しているタンパク質よりも共通に発現しているタンパク質数の方が多いことがわかった。

さらに、これらのプロテオミクス解析から得られた結果と上述した DNA マイクロアレイの結果を統合し、いくつかの小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞における機能的に差異をもたらすと推定される発現分子を同定した。以上の結果から、特定された因子がもつ機能は小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞に差異をもたらす可能性が示唆された。今後さらなる解析を進め、小腸側と大腸側腸間膜脂肪細胞における部位特異的な機能性を誘導する因子を特定していくことが必要と考えられた。

小腸側腸間膜脂肪細胞は、隣接する腸間膜静脈からアミノ酸や脂質、可消化性糖質などの栄養素が吸収され、一方、大腸側は、難消化性糖質の発酵によって得られた短鎖脂肪

酸などの有機酸が吸収され、細菌成分やその代謝物、腸内細菌叢に暴露されている。さらに、腸間膜リンパ節の数が、小腸側よりも大腸側腸間膜脂肪組織で多く、免疫細胞の分布の違いが部位の違いに寄与すると考えられる。詳細については今後さらなる検討が必要と考えられた。

本研究課題により、腸間膜脂肪組織の部位による違いが、栄養素の吸収を利用した脂肪細胞機能の制御を可能とし、食品による安全なメタボリックシンドローム予防法の開発に有効な因子の発見につながり得ると考えられた。細胞の形態などで小腸側と大腸側の腸間膜脂肪細胞を明確に分離することは難しいが、栄養学的な吸収の視点を取り入れることで小腸と大腸に分けることが初めて可能となり、機能性の差を示すに至っている。これは、腸間膜脂肪組織を一つの組織として捉える従来の考えに比べ先駆的である。

今後さらなる解析を進め、腸間膜脂肪細胞の小腸側と大腸側における機能の差異を特定する因子を明らかにし、脂肪細胞の腸間膜部位による基礎的な機能を理解すること。これにより、肥満やメタボリックシンドロームの予防、治療において、腸間膜脂肪組織部位をターゲットとした部位特異的な脂肪細胞機能を制御する新規研究領域を開拓する可能性が示唆された。さらに、吸収された栄養素と腸間膜脂肪細胞の機能的な差異との関係が明らかになれば、将来的には、メタボリックシンドロームの発症に関わる増悪因子を抑制する機能性食品の開発につながる発展性を有している。

## 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)

[学会発表](計3件)

篠木 亜季、井邊 宗一郎、Lang Weeranuch、熊谷 裕也、森 春英、木村 淳夫、石塚 敏、原 博、直鎖イソマルトメガロ糖摂取ラットにおけるケルセチン配糖体の吸収促進作用、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 26 日、名古屋大学(名古屋)

田中 誠也、篠木 亜季、原 博、ラット小腸における難消化性二糖 Melibiose の水溶性ケルセチン配糖体吸収促進作用、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学(仙台)

Aki Shinoki, Weeranuch Lang, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, Satoshi Ishizuka, Hiroshi Hara, Enhancement of quercetin glycoside absorption by -1,6-glucosaccharides in rat small intestine、International Society for Nutraceuticals and Functional Foods

Conference and Exhibition、2012 年 12 月 2 日-6 日、Courtyard King Kamehameha 's Kona Beach Hotel (Hawaii, USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠木 亜季 (SHINOKI AKI)

北海道大学・大学院農学研究院・研究員

研究者番号：60589208

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし