

令和 2 年 7 月 11 日現在

機関番号：32723

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19934

研究課題名(和文) 内因性および外因性因子によるメタボリックシンドロームの抑制性制御機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the suppressive control mechanisms of metabolic syndrome by endogenous and exogenous factors

研究代表者

田辺 由幸 (Tanabe, Yoshiyuki)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10275109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：肥満マウス腹部への振動刺激が刺激直下の脂肪組織の脂肪含量を低下させ、耐糖能を正常化させることを明らかにした。また、交雑系統マウスに、高度肥満(易肥満群)と非肥満(やせ群)の個体が存在する事を見出した。やせ群は肝臓での脂質・糖代謝の差が顕著で、幼齢期からの高脂肪食摂取によっても脂肪合成・蓄積関連遺伝子が抑制されて脂肪肝になりにくい一方、肝グリコーゲン分解が抑制され、耐糖能やインスリン感受性が正常に留まる事を見出した。近交系化したやせ系統では、上述の脂肪肝の抑制機序に加えて、小腸での脂肪酸取込に関連する遺伝子の一部に発現量が雌雄で異なるものがあった。雌は雄よりも強い肥満抵抗性を示す事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

科学的根拠に乏しかった脂肪組織に対する局所的な物理刺激の効果について、動物実験レベルながら耐糖能など全身の代謝機能にまで及ぶ事を示し、外因性制御の裏付けとなる力学刺激に対する脂肪組織の変化を遺伝子発現レベルで明らかにした。また、内因性の肥満抵抗性機序として、高脂肪食による肥満誘導に抵抗する近交系マウスを確立し、肝・小腸での分子機序の一端を示し、雌において更に強い肥満抵抗性を示すことも見出した。今後、女性の肥満と痩せにおける問題を解明するための有用なツールにもなり得る。

研究成果の概要(英文)：Abdominal vibration significantly reduced fat contents of the local adipose tissues and improve glucose intolerance in high-fat-diet (HFD) induced obese mice. We also investigated the obesity-resistant (LEAN) and the obesity-prone (FAT) subpopulations in the outbred colony of mice fed with HFD. LEAN and Fat mice showed significant differences in hepatic glucose- and fat-metabolisms. Hepatic gene expression for fat synthesis and accumulation and steatosis therein were significantly attenuated in LEAN as compared with those in FAT. Also, hepatic glycogen content of LEAN was higher than that of FAT. LEAN showed normal glucose tolerance and insulin sensitivity, whereas FAT showed severe diabetes. In addition, we have isolated the inbred mice showing either LEAN or FAT phenotypes from the original colony. There were sex differences in gene expression of lipid metabolisms in small intestine and liver, and the female LEAN showed more resistant to HFD-induced obesity.

研究分野：分子細胞薬理学

キーワード：メタボリックシンドローム 肥満抵抗性 高脂肪 脂肪肝 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、常時生体力学環境下にある循環器系や筋骨格系と同様に、脂肪細胞が間葉系起源であることに着目し、ストレッチ刺激によって脂肪細胞分化が抑制されることを見出し、その分子細胞機序を初めて報告した (J. Cell Sci. 117:3605-14, 2004 DOI:10.1242/jcs.01207)。更に、脂肪細胞のメカニカルストレス応答は、誘導型シクロオキシゲナーゼ (COX-2) の発現上昇や核内受容体 PPAR の発現低下を通じて、脂肪細胞に対する薬理作用の感作・脱感作因子として影響することを明らかにした (J. Pharmacol. Sci. 106:478-84, 2008 DOI:10.1254/jphs.FP0071886)。メタボリックシンドローム状態の肥満マウスの脂肪組織に振動刺激を与えることにより、同組織の脂肪細胞分化マーカーの減少と未分化マーカーの増大、アディポサイトカインの発現抑制や浸潤マクロファージ m の抗炎症型 (M2-m 優位) への変化が見られ、耐糖能は正常化された。即ち、メカニカルストレスは脂肪細胞の分化・更新 (リニューアル) の促進と脂肪組織の慢性炎症を抑制し、代謝症候群を改善する可能性がある。

また、高脂肪食 HFD による肥満マウス作成過程で、クローズドコロニーの ddY 系マウスのなかに、食餌性肥満誘導に抵抗性を示す個体 (HFD_{LEAN}) が 25% (120 尾中 30 尾) の割合で存在することを見出した。予備検討の結果、HFD_{LEAN} 群の耐糖能とインスリン感受性は通常食群と同等であり、摂餌量にも問題はない。近交系マウス (C3H 系統) に HFD 負荷しても、体重差は検出できないことから、ddY コロニーにおいて、内因性の肥満抑制機序をもつ個体が存在すると推察した。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 外因性刺激による脂肪組織局所でのメカニカルストレス応答が、耐糖能など全身性の代謝内分泌制御につながるメカニズムを明らかにする。また、食餌性肥満に抵抗性を示すマウス (田辺により実験的に観察された HFD_{LEAN} 個体、および分担者・前田博士により樹立された ddY-L 系統) の同等性あるいは相違点を確認し、(2) 肥満抵抗性の内因性機序と遺伝的背景の同定を目指し、代謝症候群の改善につながる知見を得る。

3. 研究の方法

交雑系 (クローズドコロニー) ddY マウスの雄性 3 週齢から高脂肪食を摂取させ、15 週後に易肥満個体 (HFD_{FAT} 群) を選別したのち、無麻酔・保定下で左下腹部に 30Hz の振動刺激を連日 30 分間・最長 2 週間まで与えた群と保定のみの対象群とを比較した。刺激直下とその反対側の精巣周囲脂肪組織については、組織切片の解析とともに、組織全 RNA およびホモジネートを取得し、各種遺伝子発現および中性脂肪やタンパクの解析に供した。また、刺激前後の空腹時血中生化学検査およびグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行った。

一方、HFD 摂取にも関わらず肥満度が通常食と同程度である個体を肥満抵抗性 (HFD_{LEAN} 群) として選別し、HFD_{FAT} 群ならびに通常食飼育個体 (ND 群) とともに、生化学検査やグルコースあるいはインスリン負荷試験を行うと共に、肝、脂肪組織、小腸などを摘出し、組織化学検査、肝脂質およびグリコーゲン測定、全 RNA を用いた逆転写リアルタイム PCR 法による各種遺伝子の発現レベルを比較した。

同様の検討は、前田が ddY コロニーから分離して近交系化した肥満抵抗性系統 (ddY-L) と易肥満系統 (ddY-H) についても高脂肪食摂取開始前後で実施し、HFD 摂取による肥満誘導の結果、認識される HFD_{LEAN/FAT} と、系統として分離されている ddY-L/H との類似点と相違点について解析した。リポタンパク質リパーゼ (LPL) 遺伝子に多形の存在が示唆されており、ddY-L および ddY-H それぞれのゲノム断片をクローニングして DNA 配列を解析した。

4. 研究成果

交雑系 ddY コロニー由来の ddY 30 尾を用いた 4 回の HFD 肥満誘導実験を行い、各回とも体重をおよそ 20~25% の割合で、通常食 (ND) 群と同等の体重変化に留まる個体 (HFD_{LEAN}) が得られた。

HFD_{LEAN} 群については飼料効率が有意に低く、グルコース負荷試験 (ipGTT) ならびに腹腔内インスリン負荷試験 (ITT) については、ND 群と同等の血糖値推移を示した。また、脂肪組織の湿重量/体重比については、腸間膜、後腹腔内、左右鼠径部皮下の何れにおいても、肥満 (HFD_{FAT}) 群に比べて有意に低値を示し、ND 群のそれと同程度であった。肝、膵、脾臓の湿重量については 3 群に差は認められなかった。また、血漿生化学検査によれば、HFD_{LEAN} 群の LDL 値は HFD_{FAT} 群に比べて有意に低値を示した。以上の結果から、ddY コロニー内において、HFD 負荷による脂肪組織の過形成に対して内因性に抵抗性をもつ個体が 1/5~1/4 程度存在することが示唆された。

肝臓の組織化学検査の結果、易肥満群 (HFD_{FAT}) に比べて肥満抵抗群 (HFD_{LEAN}) では脂肪肝が軽度であり、血中 LDL 値および肝組織でのリポタンパク質生成に関わる apoB やミクロソームトリグリセリド輸送タンパク (MTP) の遺伝子発現は、HFD_{FAT} に比べて有意に低く、ND と同レベルであった。同様に、HFD_{LEAN} では、肝での脂肪蓄積に関わる核内受容体・転写因子 (PPAR、LXR、FXR、SREBP-1a、同-1c) とそれらのエフェクター因子 (cdeb、fsp27) トリグリセリドの合成に関わる酵素群 (DGAT2、ACC1、DGAT1、FAS、SCD1)、脂肪酸の酸化に関わる酵素群 (CPT-1a、CPT-2、Aox、LCAD、MCAD)、脂肪酸やコレステロールの輸送あるいは異化排泄に関わる分子 (CD36、

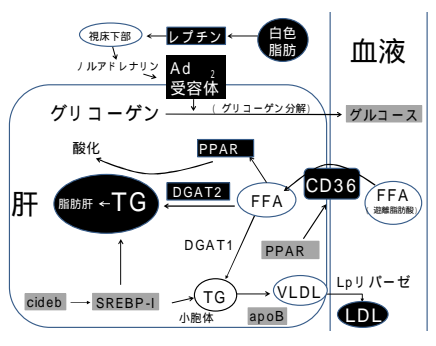
CYP7A1、ABCB11)の発現がHFD_{FAT}よりも低く、NDと同程度であった。更に、HFD_{LEAN}では血中レプチン量および肝組織₂アドレナリン受容体(₂AR)の発現が低く、肝グリコーゲン蓄積量はNDと同程度であった。以上から、HFD_{LEAN}は肝組織への脂肪酸の取り込みとTG合成機序が抑制され、また、レプチン経路による交感神経系の活性化が少なく、₂AR発現の下方制御と併せてグリコーゲン分解が起こりにくいことが推察された。(図1)

近交系化したddY-H(H系統)とddY-L(L系統)の♀それぞれについて、離乳~6週齢まで標準固形飼料(MF)を摂取させたのち、高脂肪餌(HFD、60% kcal 脂肪)、低脂肪餌(LFD、10% kcal 脂肪)を自由摂取させ、開始時6週齢、9週齢、12週齢迄の体重・摂餌量・耐糖

能試験、血漿中のグルコース・中性脂肪ならびにインスリン値、レプチン値の測定を行った。更に、肝、回腸、空腸、各種脂肪組織、視床下部、筋組織の組織全RNAの逆転写・リアルタイムPCR法により、各種遺伝子発現の解析を行った。また、ddY系統のリポタンパク質リパーゼ(LPL)遺伝子多型の既報確認の為、H系統ならびにL系統それぞれ5個体ずつの肝ゲノムDNAのLPL遺伝子の塩基配列を調べた。HFDを摂取させたH系統ではともに顕著な肥満を呈したが、₂高度の高グルコース、高トリグリセリド、高インスリン、高レプチン値を示したのに対して、₂では高インスリン・高レプチン値は呈していたものの、グルコースおよびトリグリセリド値の上昇は軽微なものに留まった。更に、L系統においては、₂ともにHFDに対する肥満誘導に抵抗性を示したが、L系統は特に強い肥満抵抗性を示し、12週齢の時点でインスリン抵抗性およびレプチン抵抗性が殆ど生じていなかった。(図2)この際、各種遺伝子発現の解析の結果、特に肝組織におけるCD36の低発現およびapoA1の有意な発現上昇が₂共通にみられた(図3)とともに、6週齢の段階でL系統の回腸におけるNPC1L1の発現レベルがH系統およびL系統に比べても低値であった。これらのことから、消化管および肝での脂質取込機構における差がL系統の肥満抵抗性に関与しており、交雑系ddYコローネからHFD飼育の結果選別される肥満抵抗群(HFD_{LEAN})と、近交系化後のddY-L系統では、個体レベルの代謝内分泌機能の特徴については性質については酷似していることが確認できたが、肝および小腸における代謝関連遺伝子の発現パターンに一部異なるものがあり、更に性差も存在する可能性が示唆された。

LPL遺伝子については、多形が存在が報告されているエクソン8,9について(J Lipid Res 53: 2024-2037, 2012)、H系統5個体、L系統5個体のゲノム配列を調べた限り全てC57BL/6と同一配列であり、既報のような多型は認められず、本研究での肥満および肥満抵抗性とは無関係と考えられた。

図1 ddY-HFDlean群の脂肪肝抑制の推定機序



注: 黒抜き 強く抑制されているもの、グレー: 抑制は有意だが軽度

図2 食餌性肥満抵抗性のddY-L系統は、高脂肪餌負荷後もメタボリックシンドロームを発症しにくい。

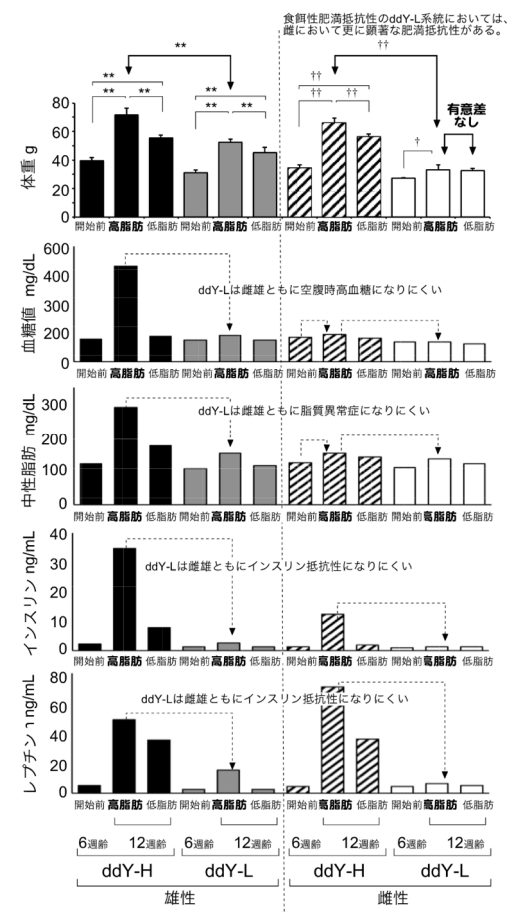
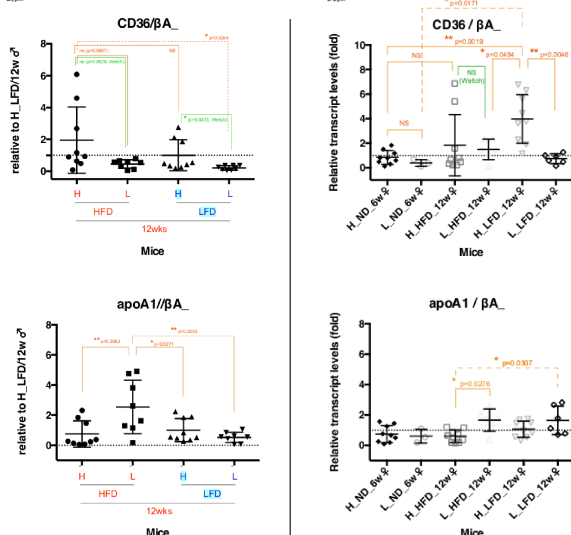


図3 近交系化したddY-LおよびH系統の肝組織での遺伝子発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田邊 由幸
2. 発表標題 ddYマウスコロニー由来の肥満誘導抵抗性個体における脂肪肝抑制および耐糖能正常化機序の解析
3. 学会等名 第39回日本肥満学会（神戸）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊 由幸、前田 利男、大石 真琴、井村 未来
2. 発表標題 Lower hepatic steatosis and normal glucose tolerance in the obesity-resistant subpopulation of ddY mice. (肥満誘導抵抗性ddY個体における脂肪肝抑制および耐糖能正常化機序の解析)
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会（大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石 真琴、井村 未来、前田 利男、田邊 由幸
2. 発表標題 ddYマウスコロニーに見出された肥満抵抗性群における肝組織遺伝子発現とグリコーゲンおよびトリグリセリド代謝機能の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiyuki Tanabe, Maki T. Saito, Koichi Nakayama.
2. 発表標題 Role of sPLA2 in rhythmic contraction of pulmonary artery of experimental PAH.
3. 学会等名 18th World congress of basic and clinical pharmacology (Kyoto) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 麻希、田辺 由幸、鎌滝 章央、澤井 高志、中山 貢一、石田 菜々絵、弘瀬 雅教
2. 発表標題 Preventive effect of olmesartan on right ventricular fibrosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. (アンジオテンシンAT1受容体遮断薬オルメサルタンのモノクロタリン肺高血圧ラット右心室線維化に対する抑制効果)
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊 由幸
2. 発表標題 ddYマウスにおいて見られた食餌性肥満に抵抗性を示す個体群の解析
3. 学会等名 第38回 日本肥満学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大沼麻子、下ノ村和貴、橋本圭祐、今村美久絵、齋藤麻希、前田利男、田邊由幸
2. 発表標題 高脂肪食による肥満誘導に抵抗性を示すddY個体群における肝糖脂質代謝機能の解析
3. 学会等名 第138回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本圭祐、今村美久絵、大沼麻子、下ノ村和貴、齋藤麻希、前田利男、田邊由幸
2. 発表標題 高脂肪食による肥満誘導に抵抗性を示すddY個体群の肝臓におけるアドレナリン 受容体の発現低下とグリコーゲン蓄積について
3. 学会等名 第138回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	前田 利男 (Maeda Toshio) (00137069)	静岡県立大学・薬学部・客員教授 (23803)	
研究 分担者	斉藤 麻希 (Saito Maki) (40365185)	岩手医科大学・薬学部・助教 (31201)	