

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780249

研究課題名（和文）血管新生因子による肥育牛のアディポジェネシス制御機構の解明

研究課題名（英文）Studies on the expression of angiogenic growth factors during adipogenesis in fattening beef cattle.

研究代表者

山田 知哉（YAMADA TOMOYA）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜飼養技術研究領域・主任研究員

研究者番号：80343987

研究成果の概要（和文）：肉牛の脂肪組織における血管新生因子発現について検討を行った。血管新生因子遺伝子の発現量は、腸間膜脂肪、筋間脂肪及び腎周囲脂肪において、皮下脂肪や筋肉内脂肪より高い値であった。また血管新生因子遺伝子の発現量と脂肪細胞サイズに正の相関が認められた。さらに粗飼料多給では濃厚飼料多給より脂肪細胞のサイズが大型化すると共に、血管新生因子遺伝子の発現量が高くなった。以上より、血管新生因子の発現制御メカニズムとして、脂肪細胞のサイズが影響している可能性が推察された。

研究成果の概要（英文）：In this experiment, we studied on the expression of angiogenic growth factor gene in adipose tissue of beef cattle. Intermuscular, renal, and mesenteric adipose tissues expressed significantly higher angiogenic growth factor mRNA levels than did subcutaneous and intramuscular adipose tissues. A significant correlation existed between adipocyte size and angiogenic growth factor mRNA levels. In addition, the expression of the angiogenic growth factor genes and adipocyte size in the high-roughage feeding group was significantly higher than in the high-concentrate feeding group. These results indicate that fat depot-specific difference in angiogenic growth factor gene expression result from the difference in adipocyte size.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学、獣医学・畜産学・草地学

キーワード：飼養、肥育、アディポジェネシス

1. 研究開始当初の背景  
脂肪組織の成長は、脂肪細胞数の増加及び細

胞内に脂肪滴を蓄積して成熟肥大化する分化過程に大別され、これら一連の過程は「ア

ディポジェネシス」と総称される。研究代表者のこれまでの検討において、核内転写因子 C/EBP ファミリーがウシにおける脂肪細胞分化制御に重要な役割を果たしていることが解明された。一方、最近の研究において、ヒトや実験動物における脂肪組織の成長には血管新生が必須であり、血管新生の抑制は脂肪組織を消失させることが報告された。加えて、成熟脂肪細胞自身が血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) といった血管新生因子を分泌することによって脂肪組織内の血管新生を誘導していることが判明した。VEGF や bFGF は血管内皮細胞に対する強力な増殖作用を有しており、血管新生制御を行うマスターレギュレーターである。個々の脂肪細胞の肥大化には限界があることから、ヒトや実験動物では脂肪細胞自らが血管新生を促進することによって新生血管周囲の脂肪細胞数を増加させることが明らかとなっているが、反芻動物においては未だ不明である。したがって、肥育牛のアディポジェネシスを解明するためには、個々の脂肪細胞自身の分化制御機構の解明に加え、脂肪細胞と血管の相互作用を明らかにすることが必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、肥育牛脂肪組織における血管新生因子発現とアディポジェネシスとの関連を明らかにするため、アディポジェネシスに大きく影響する (1) 脂肪蓄積部位、(2) 栄養条件、(3) ウシ品種、という3つの要因からのアプローチを行うことを目的とした。

(1) 脂肪蓄積部位による影響としては、皮下、内臓、筋間、筋肉内及び腎周囲の各脂肪組織における血管新生因子発現量を比較し、蓄積部位の違いによる脂肪細胞の増殖・分化

能の差が血管新生因子の発現パターンの違いによって生じていることを明らかにすることを目的とした。

(2) 栄養条件による影響としては、粗飼料多給区、濃厚飼料多給区をそれぞれ設定して肥育を行い、粗濃比の違いによって生じる体脂肪蓄積の差が、血管新生因子の発現量の変動によるものであることを明らかにすることを目的とした。

(3) ウシ品種による影響としては、脂肪蓄積能力の大きく異なる黒毛和種及びホルスタイン種の肥育を行い、品種の違いによる脂肪組織成長能力の差が血管新生因子の発現量の違いによって制御されていることを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

肥育牛における血管新生因子とアディポジェネシスとの関連を明らかにするため、本研究ではアディポジェネシスに大きく影響する (1) 脂肪蓄積部位、(2) 栄養条件、(3) ウシ品種の違いが、脂肪組織における血管新生因子発現に及ぼす影響を検討した。

(1) 脂肪蓄積部位が肥育牛脂肪組織の血管新生因子発現及びアディポジェネシスに及ぼす影響。

供試牛として 30 ヶ月齢黒毛和種去勢牛を用いた。屠殺時に、皮下脂肪、内臓脂肪、筋間脂肪、筋肉内脂肪、腎周囲脂肪の各脂肪組織を採取した。これらの部位において血管新生を制御するキーファクターである VEGF や bFGF 等の血管新生因子の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて測定した。さらにオスミウム染色法により脂肪細胞の肥大化のパラメ

ータであるセルラリティーを測定し、脂肪細胞の形態的な差が、血管新生因子発現に及ぼす影響を検討した。

(2) 栄養条件が肥育牛脂肪組織の血管新生因子発現及びアディポジェネシスに及ぼす影響。

供試牛として黒毛和種去勢牛を用い、10ヶ月齢から30ヶ月齢までの肥育期間に、①粗飼料多給区(TDNベース粗濃比35:65に設定)、②濃厚飼料多給区(TDNベース粗濃比10:90に設定)に設定した肥育を行った。増殖・分化能が大きく異なる各脂肪部位のサンプルを採取し、血管新生因子の発現量を測定した。さらに、枝肉を解体し、各脂肪部位におけるセルラリティーを測定し、血管新生因子発現との関連を検討した。これらの解析を通じ、栄養条件が血管新生因子によるアディポジェネシス制御に及ぼす影響を検討した。

(3) ウシ品種が肥育牛脂肪組織の血管新生因子発現に及ぼす影響。

本研究では、供試牛として脂肪蓄積能力の大きく異なる黒毛和種及びホルスタイン種去勢肥育牛を用いた。肥育終了時に各脂肪部位のサンプルを採取し、血管新生因子の発現量を検討した。さらに、枝肉の解体を行い各脂肪組織におけるセルラリティーを測定し、品種差によって生じる脂肪部位毎の形態的な差を検討した。これらの解析により、ウシ品種が血管新生因子発現を介しアディポジェネシスに及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) これまでの国内外の研究において、反芻動物の脂肪組織における血管新生因子の発現に関する報告はなく、血管新生因子が肥育牛のアディポジェネシスに及ぼす影響は未だ不明である。そこで、肉用牛の脂肪組織における血管新生因子発現について、脂肪部位別に検討を行った。その結果、VEGF、FGF2、並びに leptin 遺伝子の発現量は、皮下脂肪及び筋肉内脂肪組織と比較し、腸間膜脂肪、筋間脂肪並びに腎周囲脂肪組織で高いことを見いだした。次に各脂肪部位と脂肪細胞サイズとの関連を検討した結果、筋間、腎周囲並びに腸間膜脂肪細胞は、皮下及び筋肉内脂肪細胞より肥大していることが判明した。さらに VEGF、FGF2、並びに leptin 遺伝子の発現量と、脂肪細胞のサイズの間には有意な正の相関が認められた。毛細血管からの酸素透過性は細胞径が増大するに伴い低下すること、肥大化した脂肪細胞は低酸素ストレス状態にあることが報告されている。更に、低酸素条件下では培養脂肪細胞における VEGF や leptin 遺伝子の発現が促進されることが明らかとなっている。従って、脂肪細胞サイズの大きな筋間、腎周囲および腸間膜脂肪細胞では、脂肪細胞サイズの小さい皮下や筋肉内脂肪細胞と比較し低酸素状態にあり、このことが血管新生因子遺伝子の発現量の増加に影響している可能性が推察された。これらの結果から、肥育牛のアディポジェネシス制御機構を解明する上で、血管新生因子は重要なキーファクターであると考えられた。

(2) 給与飼料条件が、脂肪組織における血管新生因子発現に及ぼす影響は、ヒトや実験動物を含めこれまで不明であった。そこで、10ヶ月齢から30ヶ月齢までの肥育全期間に、

粗飼料或いは濃厚飼料を多給した肥育を行い、各脂肪組織における血管新生因子及び脂肪細胞分化調節因子の発現量を検討した。その結果、VEGF 遺伝子の発現は、粗飼料多給区の腸間膜脂肪および筋間脂肪において濃厚飼料多給区より高い値であった。FGF2 遺伝子の発現も同様の傾向であった。一方、脂肪細胞分化調節転写因子遺伝子 PPAR $\gamma$  や C/EBP $\beta$  の発現は、濃厚飼料多給区の皮下および筋肉内脂肪において粗飼料多給区より高い値であった。一方、脂肪細胞のサイズは、腸間膜脂肪並びに筋間脂肪において粗飼料多給区が濃厚飼料多給区よりサイズが大きかった。以上より、粗飼料給与条件が肥育牛の脂肪組織における血管新生因子の発現に及ぼす影響は脂肪部位によって異なり、脂肪細胞サイズの大きな粗飼料多給区における腸間膜脂肪ならびに筋間脂肪で発現量が上昇することが明らかとなった。これらの結果から、給与飼料条件によって変動する血管新生因子の発現が、アディポジェネシス制御に重要な役割を果たしていることが推察された。

(3) 遺伝的に脂肪蓄積能力が異なる場合、脂肪組織における血管新生因子の発現量に差が生じている可能性が考えられるが、ヒトや実験動物を含め明らかではない。そこで、脂肪蓄積能力の異なる黒毛和種とホルスタイン種肥育牛の脂肪組織における血管新生因子遺伝子発現に関して検討を行なった。その結果、脂肪細胞のサイズは、皮下脂肪及び筋間脂肪には品種差が認められなかったが、内臓脂肪のサイズは、黒毛和種がホルスタイン種より大きい傾向が認められた。一方、VEGF 遺伝子の発現量は、内臓脂肪においてホルスタイン種が黒毛和種より高い傾向にあった。一方、bFGF 発現量には、品種差は認められなかった。以上の結果から、脂肪細胞

の成熟肥大化の品種差は内臓脂肪において顕著であること、内臓脂肪組織成長における VEGF 発現を介した血管新生誘導能はホルスタイン種が黒毛和種より高い可能性が推察された。

以上の結果から、肥育牛のアディポジェネシス制御における、マスターレギュレーターとしての血管新生因子の重要性が明らかとなった。今後、アディポジェネシス制御機構を解明していく上で、脂肪細胞自身の分化活性状態に加え、脂肪細胞自身が誘導する血管新生とのクロストークに着目する必要があると考えられた。

## 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 2 件)

①Tomoya Yamada, Naoto Nakanishi. Effects of the roughage/concentrate ratio on the expression of angiogenic growth factors in adipose tissue of fattening Wagyu steers. *Meat Science*. 90:807-813, 2012 (査読有) [doi:10.1016/j.meatsci.2011.11.019](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.11.019)

②Tomoya Yamada, Shinichi Kawakami, Naoto Nakanishi. Fat depot-specific differences in Angiogenic growth factor gene expression and its relation to adipocyte size in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72:991-997, 2010 (査読有) [doi : org/10.1292/jvms.10-0031s.10-0031](https://doi.org/10.1292/jvms.10-0031s.10-0031)

[学会発表] (計 2 件)

①山田知哉、樋口幹人、中西直人、黒毛和種肥育牛における粗濃比の違いが脂肪組織における血管新生因子の発現に及ぼす影響、日本畜産学会第 115 回大会、2012. 3. 30、名古屋

屋大学

②山田知哉、河上眞一、中西直人、肉用牛における脂肪組織部位の違いが血管新生因子の発現に及ぼす影響、日本畜産学会第 112 回大会、2010. 3. 29、明治大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 知哉 (YAMADA TOMOYA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜飼養技術研究領域主任研究員

研究者番号：80343987