

機関番号： 17601

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009 年度～2010 年度

課題番号： 21880037

研究課題名（和文）新規エネルギー代謝調節因子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Exploratory and functional analysis of new regulatory factor on energy metabolism

研究代表者

秋枝 さやか（AKIEDA SAYAKA）

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教

研究者番号： 20549076

研究成果の概要（和文）：ラットに 60%の脂質を含む高脂肪食を給餌し、エネルギー摂取量および体重をモニターしたところ、約 10%のラットが、普通食摂取ラットの体重を下回る高脂肪食耐性（DR）ラットであることが明らかになった。これらのラットの中には、腸間膜脂肪蓄積量が少なく耐糖能が正常で、インスリン感受性が極めてよいものが含まれていた。DR ラットの行動量、酸素消費量、呼吸商、体温は、普通食ラットに比べて差を認めなかった。DR ラットの腸間膜脂肪組織から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行ったところ、7 匹中 3 匹で、水・電解質関連ペプチドとその受容体の発現が有意に増加していることが明らかになった。また、これらは、腸間膜脂肪組織のマクロファージに存在していた。今後、同定したペプチドおよび受容体を発現したマクロファージと脂肪細胞の共培養や、これらの遺伝子を導入したマクロファージ特異的ダブルノックインラットを作製し、解析する予定である。

研究成果の概要（英文）：High fat diet (HFD) is well known to be one of the contributing factors for the development of obesity. When rats were bred with 60% HFD, most of them show a state of increased body weight with high adiposity. However, we found that 10% rats bred with HFD demonstrate obesity-resistant [diet resistant (DR)] that their weights are less than those of either diet-induced obesity (DIO) or control rats. We found that the mesenteric fat mass of DR rats was significantly less than that of DIO rats and similar to that of control rats, even though there were no differences in spontaneous activity, calorie intake, respiratory quotient and body temperature between DIO and DR rats. To examine the gene expressions specific for the mesenteric adipose tissues of DR rats, we performed DNA microarray analysis. A new bioactive peptide (gene X) and its receptor (gene Y) were found as specific expressed genes in three out of seven DR rats, and these genes were expressed in the macrophage of adipose tissue. We will examine the effects of co-culturing of rat primary mesenteric adipocytes with macrophages expressing gene X and gene Y on adipogenesis. Moreover, we are preparing the analysis in double (gene X and Y) knock-in Tg rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学
キーワード：脂肪組織、エネルギー代謝調節、肥満、生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

1994年のレプチンの発見を皮切りに、脂肪細胞は単に脂肪の蓄積だけでなく、多くの生理活性物質を産生し血中に分泌することで、肝臓、筋肉、膵臓などでの糖・エネルギー代謝に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。in vitroの研究では、肥大化した脂肪細胞から分泌される MCP-1 などのケモカインがマクロファージを動員し、脂肪組織に浸潤したマクロファージに由来する炎症性物質が、肥満の病態形成に関与しているという研究成果も報告されている。しかし、多くの基礎・臨床研究や疫学研究が、脂肪細胞の肥大化と肥満との密接な関連を示しているにもかかわらず、脂肪細胞の分化・肥大化のメカニズム、エネルギー恒常性破綻機構や肥満発症機構に関する分子メカニズムの全容は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

生体は、日々のエネルギーの摂取の変動にも肥大化と肥満との密接な関連を示しているにもかかわらず、体重を一定レベルに保つための高い恒常性維持機構を備えている。しかし、高カロリー摂取や運動不足などによるエネルギー消費の低下は、エネルギー恒常性の破綻を招き、いわゆる食事(餌)性肥満をもたらす。今回、私たちは、高脂肪食(高カロリー食)を摂取したラットの中に、普通食摂取ラットの体重を下回り、腸間膜脂肪蓄積のきわめて少ない高脂肪食耐性ラット(diet-resistant; DR)が存在することを見出した。本研究は、この DR ラットを用い新規肥満制御因子を探索し、その分子機構を解明することにより、新たなエネルギー代謝調節のシステムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食肥満(DIO)および高脂肪食耐性(DR)ラットの作出

3 週齢の雄性 SD ラットを高脂肪食群(タンパク質 20%、糖質 20%、脂質 60%[kcal%])と普通食群(タンパク質 20%、糖質 70%、脂質 10%[kcal%])に分けて飼育する。摂餌量および体重を連日測定し、高脂肪食摂取群の中で普通食群の平均体重を上回るラットを高脂肪食肥満(DIO)ラット、普通食群の平均体重を下回るラットを高脂肪食耐性ラット(DR ラット)と定義する。

(2) DIO, DR およびコントロールラットのエネルギー代謝特性の検討

高脂肪食摂取後 1 週間毎に、中性脂肪、HDL

コレステロール、LDL コレステロールなどの血中脂質を測定し、脂質代謝に関わるホルモンであるレプチン、アディポネクチン、グレリン、コルチコステロンを測定する。また、糖代謝機能を調べるために高脂肪食摂取後 1 週間毎に、血糖、インスリンの基礎値を測定し、高脂肪食投与 8 週後にグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行い、耐糖能およびインスリン感受性を評価する。さらに、DIO、DR、コントロールラットの体温、酸素消費量、呼吸商、行動量を測定し、各群ラットのエネルギー特性を明らかにする。小動物 CT 装置にて各群ラットの腸間膜周囲、精巣周囲、皮下脂肪の比率および筋肉量を測定する。

(3) DIO, DR およびコントロールラットの腸間膜脂肪組織での遺伝子発現解析

予備の実験では、DIO、DR およびコントロールラット(n=1)の腸間膜周囲脂肪より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行ったが、さらに例数を増やし、エネルギー代謝調節や摂食調節、糖・脂質代謝に関わるタンパク質、酵素、転写調節因子などの発現を解析する。得られた結果から、DR で顕著に変動する遺伝子を選び、それらの遺伝子によりコードされる分子の細胞内シグナル伝達機構を含めた関連分子の発現を定量 PCR 系にて解析する。また、DR 特異的な肥満制御物質の受容体候補を DNA マイクロアレイの解析結果からピックアップし、腸間膜脂肪組織での受容体遺伝子発現を定量 PCR で解析する。

(4) DR ラット特異的な肥満制御物質の産生細胞の同定

DR ラット特異的な肥満制御物質や受容体候補を DNA マイクロアレイの解析結果からピックアップし、cRNA プローブあるいは特異的抗体を作製し、DIO、DR、コントロールラットの腸間膜脂肪組織での分布を in situ hybridization 法や免疫組織化学法にて明らかにする。腸間膜脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後、ナイロンフィルターを通過させ遠心して細胞分画と stromal-vascular cell fraction(SVF)に分ける。得られた SVF を FACS(fluorescence-activated cell sorting)にて、血管内皮、マクロファージ、白血球分画に分け、それぞれの分画から RNA を抽出し、RT-PCR 法で受容体およびリガンドの発現分画を確認する。

(5) DR 特異的な肥満抑制物質受容体の発現細胞株を用いた機能解析

(4) で同定した受容体産生細胞の細胞株、初

代培養系あるいは発現ベクターを導入した受容体高発現細胞に、DR 特異的肥満制御物質を添加し、セカンドメッセンジャー(cAMP、cGMP、イノシトール三リン酸、ジアシルグリセロール、カルシウムイオン)の増減を確認する。これらの細胞と脂肪細胞へと分化する3T3L1細胞とを共培養し、脂肪細胞の分化や肥大化に及ぼす影響を検討する。

(6)DR特異的肥満制御物質および受容体のダブルノックインラットの作製DR特異的肥満制御物質およびその受容体の発現細胞を特定した後、標的遺伝子のbacterial artificial chromosome ゲノムクローンを用いた組織特異的ダブルノックインラット(DR特異的肥満制御物質とその受容体)を作製する。全ての臓器からRNAあるいは蛋白を抽出し、標的分子の発現状況を確認する。

(7) DR特異的肥満制御物質および受容体のダブルノックインラットのエネルギー代謝特性の検討

ダブルノックインラットを普通食と高脂肪食とに分けて飼育し、摂餌量、体重を連日モニターする。その結果、このラットが高脂肪食に耐性のphenotypeを示すかどうかを判定する。高脂肪食摂取後1週間毎に、血中脂質、レプチン、アディポネクチン、UCP1、グレリン、コルチコステロンを測定する。また、高脂肪食摂取後1週間毎に、血糖、インスリンの基礎値を測定し、高脂肪食投与8週後にグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行い、耐糖能およびインスリン感受性を評価する。さらに、ダブルノックインラットのエネルギー消費のパラメーターおよびCT装置を用いて腸間膜周囲、精巣周囲、皮下脂肪の比率および筋肉量を測定する。

4. 研究成果

(1)高脂肪食肥満(DIO)および高脂肪食耐性

(DR)ラットの作出

ラットに60%の脂質を含む高脂肪食を給餌し、エネルギー摂取量および体重をモニターしたところ、約10%のラットが、普通食摂取ラットの体重を下回るDRラットであることが明らかになった。

(2)DIO、DRおよびコントロールラットのエネルギー代謝特性の検討

小動物CT装置による解析により、DIOラットはコントロールラットに比べ脂肪率が高く腸間膜脂肪細胞の直径が著しく大きくなっていったが、DRラットではコントロールラットとほぼ同程度の脂肪率と腸間膜脂肪細胞の直径であり、腸間膜脂肪組織全体の体積は減少していた。また、脂質代謝に関わるホルモ

ンである中性脂肪、HDLコレステロール、LDLコレステロールなどの血中脂質は、コントロールラットに比べDIOラットのみ中性脂肪とLDLコレステロールの濃度が減少していた。また、脂質代謝に関わるホルモンであるレプチン、アディポネクチンは、コントロールラットに比べDIOラットで増加傾向が認められたが、DRラットではほぼ同様の発現であった。これらの結果から、DIOラットでは腸間膜脂肪の著しい蓄積が認められるが、DRラットでは腸間膜脂肪の蓄積が少ないことが明らかになった。また、糖代謝機能を検討した結果、血糖値には群間に差が認められないが、DIOラットはインスリンの基礎値が著しく亢進しインスリン抵抗性を呈した。さらにグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行い、耐糖能およびインスリン感受性を検討した結果、DRラットはインスリン感受性が良いことが判明した。自発運動量、摂取エネルギー、酸素消費量は、いずれも群間に差は認められなかったことから、高脂肪食耐性を示すDRラットは、特異的なエネルギー代謝調節機構を有していると考えられる。

(3)DIO、DRおよびコントロールラットの腸間膜脂肪組織での遺伝子発現解析

DRラットの腸間膜脂肪組織からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを行ったところ、7匹中3匹で、水・電解質関連ペプチドとその受容体の発現が有意に増加していることが明らかになった。

(4)DRラット特異的な肥満制御物質の産生細胞の同定

(3)で同定したペプチドおよび受容体は、腸間膜脂肪組織のマクロファージに存在していた。

(5)DR特異的肥満抑制物質受容体の発現細胞株を用いた機能解析

(3)で同定した受容体を発現しているマクロファージを用いて、DR特異的肥満制御物質を添加すると、セカンドメッセンジャーであるcGMPが増加した。今後、これらの細胞と脂肪細胞へと分化する3T3L1細胞とを共培養し、脂肪細胞の分化や肥大化に及ぼす影響を検討する。また、現在マクロファージに特異的に発現させたダブルノックインラット(DR特異的肥満制御物質とその受容体)を作製中であり、今後この動物のエネルギー代謝特性を調べる予定である。

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5件)

Mutoh E, Senba K, Akieda-Asai S, Miyashita A, Poleni PE., Date Y: Sex differences in energy metabolism in pre-pubescent, early pubescent and adult rats. *Obesity Research & Clinical*, 5, e119-128, 2011, 査読有

Akieda-Asai S, Kahyo T, Zaima N, Yao I, Hatanaka T, Ikegami K, Iemura S, Sugiyama S, Yokozeki T, Eishi Y, Koike M, Ikeda K, Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I, Song SY, Matsuno A, Mizutani A, Sawabe M, Chao MV, Tanaka M, Kanaho Y, Natsume T, Date Y, McBurney MW, Guarente L, Setou M: SIRT1 regulates thyroid-stimulating hormone release by enhancing PIP5K γ activity through deacetylation of specific lysine residues in mammals. *PLoS One*, 5(7), e11755, 2010, 査読有

Ageta H, Akieda-Asai S, Sugiura Y, Goto-Inoue N, Zaima N, Setou M: Layer-specific sulfatide localization in rat hippocampus middle molecular layer is revealed by nanoparticle-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Medical Molecular Morphology*, 42(1), 16-23, 2009, 査読有

Ohta R, Shirota M, Kanazawa Y, Shindo T, Furuya M, Seki T, Ono H, Kojima K, Akieda-Asai S, Watanabe G, Taya K: Effects of transmaternal exposure to genistein in Hatano high- and low-avoidance rats. *Experimental Animals*, 58 (5), 2009, 471-479, 査読有

秋枝さやか, 伊達紫. 食行動を制御する臓器間クロストーク. *化学と生物*, 47(11), 750-755, 2009, 査読無

[学会発表](計8件)

秋枝さやか, 武藤絵里, 仙波和代, Paul-Emile Poleni, 伊達紫, 過剰エネルギー摂取における性差, 第150回日本獣医学会, 帯広, September.16-18.2010.

Date Y, Mutoh E, Akieda-Asai S, Senba K, Sex difference in pre-puberty, early puberty and adult rats on energy metabolism, 第14回国際内分泌学会, 京都, March.30.2010.

Horii Y, Jaroenporn S, Akieda-Asai S, Wang K, Ohta R, Shirota M, Watanabe G, Taya K, Endocrine mechanisms responsible for different ovarian follicular development during estrous cycle between high- and low-avoidance rats, 第14回国際内分泌学会, 京都, March.27.2010.

秋枝さやか, 長寿遺伝子SIRT1によるホ

ルモン分泌制御機構, 第3回FANTASY, 東京, February.7.2010.

Setou M, Akieda-Asai S, Kahyo T, Zaima N, Yao I, Date Y, McBurney MW, Guarente L, SIRT1 deacetylates PIP5K- γ to enhance exocytosis of thyroid-stimulating hormone, *Exciting Biologies: Biology in Balance*, Buenos Aires, Argentina, October.9.2009.

仙波和代, 武藤絵里, 秋枝さやか, 野口賀津子, 伊波英克, 伊達紫, 西園晃, 狂犬病ウイルス感染における骨髄系樹状細胞の機能解析, 分子生物学会第9回春季シンポジウム, 宮崎, May.11.2009.

武藤絵里, 秋枝さやか, 仙波和代, 伊達紫, Sex difference in pre-puberty, early puberty and adult rats on energy metabolism, 分子生物学会第9回春季シンポジウム, 宮崎, May.11.2009.

Akieda-Asai S, Kahyo T, Yao I, Zaima N, Senba K, Mutoh E, Date Y, Setou M, SIRT1 regulates thyroid-stimulating hormone secretion through phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ , 分子生物学会第9回春季シンポジウム, 宮崎, May.11.2009.

[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

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/peptides/date/jp/>

新聞報道等

- ・ 「甲状腺刺激 長寿効果も」 中日新聞、
2010年7月27日
- ・ 「甲状腺刺激で長寿効果も」 浜松医大など研究グループが機能解明、中日新聞 web、
2010年7月27日
- ・ 「長寿関連たんぱく質 SIRT1」 科学新聞、
2010年7月30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋枝 さやか (AKIEDA SAYAKA)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教
研究者番号：20549076

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：