

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580399

研究課題名(和文)酸化ストレス応答を介した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 effects of oxidative stress on bovine adipogenesis

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪組織における酸化ストレス状態が肥育牛のアディポジェネシスに及ぼす影響を検討した。腸間膜脂肪におけるMMP9遺伝子の発現は、皮下脂肪および筋肉内脂肪と比較し高い傾向にあった。また血中酸化ストレスマーカーであるイソプラスタンの濃度は、濃厚飼料多給区が粗飼料多給区より有意に高かった。さらに牛品種の違いによる影響を検討した結果、ホルスタイン種の腸間膜脂肪におけるpref-1遺伝子の発現は黒毛和種より高い値であった。以上の結果から、酸化ストレス状態は肥育牛のアディポジェネシス制御において重要な役割を果た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 effects of oxidative stress on bovine adipogenesis. Mesenteric adipose tissues expressed higher MMP9 gene than did subcutaneous and intramuscular adipose tissues. The plasma concentrations of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, were significantly higher in the high-concentrate feeding group than in the high-roughage feeding group. In addition, the expression level of pref-1 genes in mesenteric adipose tissue of Holstein was significantly higher than that of Japanese black cattle. These results suggest that oxidative stress play an important role during bovine adipogenesis.

研究分野：家畜栄養生理学

キーワード：栄養・飼養 肥育牛 脂肪細胞

## 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。一方、脂肪組織の成長には血管新生が必須であり、脂肪細胞自らが血管新生を誘導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アディポジェネシスに不可欠であることが解明された。加えて肥満のヒトや実験動物における脂肪組織は慢性炎症状態にあり、この原因として脂肪細胞の肥大化によって脂肪細胞に酸化ストレスが生じていることが判明した。さらに、ヒトや実験動物では、酸化ストレスに応答し脂肪細胞自身が酸化ストレス応答因子を発現することによって、脂肪組織における血管新生を促進していることが明らかとなった。MMP は、細胞外マトリクスに対する強力な消化作用を有しており、細胞外マトリクスの分解とそれに引き続く血管内皮細胞の遊走を通じ、アディポジェネシスに必須の血管新生促進制御を行うマスターレギュレーターである。またヒトや実験動物において、血管新生因子やアディポカインも酸化ストレス状態に応じて発現が変動することが報告されている。したがって、肥育牛におけるアディポジェネシス制御機構を解明するためには、ウシ脂肪細胞自身の分化メカニズムの解明に加え、脂肪細胞と酸化ストレスと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

肉牛では蓄積部位によって脂肪の経済価値が大きく異なることから、自給飼料を積極的に活用した肥育や、牛品種の特性に応じた牛肉生産を考える場合において、脂肪部位毎の蓄積能力を的確に把握することが必要となってくる。脂肪蓄積部位や、栄養条件、ウシ品種は、肥育牛のアディポジェネシスに大きく影響する。部位や、栄養条件、品種といった要因は、脂肪細胞における酸化ストレスの強弱に影響を及ぼし、その結果酸化ストレス応答因子の発現量が変動することにより、アディポジェネシスに必須である脂肪組織内の血管新生の誘導を制御していると推察される。従って、酸化ストレス応答因子をアディポジェネシス制御を行うキーファクターとして積極的に評価することが、今後、肥育牛の飼養管理技術を改善していく上で不可欠であると考えられる。そこで本計画では、ウシ脂肪細胞における酸化ストレス応答がアディポジェネシスに及ぼす影響を明らかにするため、

(1)「脂肪部位」の違いが、脂肪細胞における酸化ストレス応答に及ぼす影響

(2)「栄養条件」の違いが、脂肪細胞における酸化ストレス応答に及ぼす影響

(3)「ウシ品種」の違いが、脂肪細胞における酸化ストレス応答に及ぼす影響  
これら(1)-(3)の影響を解明することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)「脂肪部位」の違いが、脂肪細胞における酸化ストレス応答に及ぼす影響

供試牛として、平均月齢 30 か月齢の黒毛和種去勢肥育牛を用いた。肥育期間中は濃厚飼料と乾草を飽食させ、と畜時に皮下、腸間膜、筋肉内の各脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織中の RNA は Ribo Pure kit (Ambion) を用いて抽出し、Revertra Ace qPCR RT kit (Toyobo) にて逆転写を行なった。各脂肪組織における酸化ストレス応答因子発現は、Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いリアルタイム PCR 法で測定した。各脂肪部位における脂肪細胞のサイズはオスミウム染色法を用いて測定した。これらの検討から、脂肪蓄積部位の違いが、酸化ストレス応答因子発現に及ぼす影響を解明することを目的とした。

(2)「栄養条件」の違いが、脂肪細胞における酸化ストレス応答に及ぼす影響

供試牛として、黒毛和種去勢肥育牛を用いた。粗飼料多給区は、給与粗飼料としてロールペールサイレージを用い、給与飼料中の粗飼料給与割合を 30% に設定した混合飼料を給与した。濃厚飼料多給区には、給与飼料中の粗飼料給与割合を 10% に制限して乾草を給与した。30 ヶ月齢時にと畜を行い、脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織中の RNA は Ribo Pure kit (Ambion) を用いて抽出し、Revertra qPCR RT kit (Toyobo) にて逆転写を行なった。各脂肪組織中の酸化ストレス応答因子遺伝子発現は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いリアルタイム PCR 法で測定した。さらに、血中の酸化ストレスマーカーであるイソプラスタン濃度を測定し、給与粗飼料条件が、血中の酸化ストレス状態に及ぼす影響を検討した。これらの検討から、給与飼料条件の違いが、酸化ストレス応答因子発現に及ぼす影響を解明することを目的とした。

(3)「ウシ品種」の違いが、脂肪細胞における酸化ストレス応答に及ぼす影響

供試牛として脂肪蓄積能力の大きく異なる黒毛和種去勢肥育牛並びにホルスタイン種去勢肥育牛を用いた。と畜時に皮下脂肪並びに腸間膜脂肪サンプルを採取した。採取した脂肪組織中の RNA は Ribo Pure kit (Ambion) を用いて抽出し、Revertra qPCR RT kit (Toyobo) にて逆転写を行なった。各脂肪組織の酸化ストレス応答因子の発現は

Thunderbird SYBR qPCR Mix(Toyobo)を用いリアルタイム PCR 法で測定した。これらの検討から、ウシ品種の違いが脂肪組織における酸化ストレス応答因子発現に及ぼす影響を解明することを目的とした。

#### 4. 研究成果

(1) 脂肪部位の違いは、脂肪細胞における酸化ストレス応答に影響を及ぼすと推察される。本研究において、各脂肪組織における MMP9 遺伝子の発現量を検討した結果、MMP9 遺伝子の発現は、皮下脂肪および筋肉内脂肪と比較し、腸間膜脂肪における発現量が有意に高い結果となった。次に脂肪蓄積部位の違いが脂肪細胞サイズに及ぼす影響を検討した結果、皮下脂肪および筋肉内脂肪と比較し、腸間膜脂肪が有意に大きい値であった。脂肪細胞は、肥大化に伴い細胞への酸化ストレスが増加することから、腸間膜脂肪は、皮下脂肪や筋肉内脂肪より強い酸化ストレス状況下にあると考えられる。従って、脂肪細胞における酸化ストレス応答因子の発現制御メカニズムとして、各脂肪蓄積部位における脂肪細胞のサイズの違いによる酸化ストレス状態の違いが大きく影響している可能性が推察された。

(2) 栄養条件の違いは、脂肪細胞における酸化ストレス応答に影響すると考えられる。本研究において各脂肪組織における酸化ストレス応答因子の発現を検討した結果、MMP2 遺伝子の発現が、腸間膜脂肪において濃厚飼料多給区が粗飼料多給区より高い傾向にあった。また腸間膜脂肪では、酸化ストレスに応答して発現が上昇する血管新生因子 VEGF や FGF2、並びにアディポカイン leptin や adiponectin の発現が、濃厚飼料多給区において粗飼料多給区より有意に高い発現となった。一方、皮下脂肪では、MMP や血管新生因子の発現に、粗飼料多給区と濃厚飼料多給区の差は認められなかった。さらに、血中酸化ストレスマーカーであるイソプラスタンの濃度は、濃厚飼料多給区が粗飼料多給区より有意に高い値となった(図1)。従って、

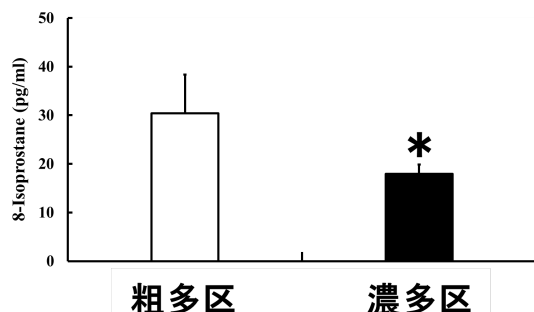


図1. 血中イソプラスタン濃度

本研究の結果から、飼料給与条件の違いは、主に内臓脂肪細胞の酸化ストレスに影響を

及ぼし、濃厚飼料多給区における腸間膜脂肪細胞の酸化ストレス状態が亢進することによって酸化ストレス応答因子等の発現が上昇するとともに、血中の酸化ストレスマーカーの値も上昇すると考えられた。さらに本研究の結果から、粗飼料多給条件と比べ濃厚飼料多給条件下では肥育牛の酸化ストレス状態が亢進しやすい可能性が推察された。

(3) ウシ品種の違いによる脂肪蓄積能力の差は、脂肪細胞における酸化ストレス応答に影響を及ぼすと推察される。本研究において黒毛和種とホルスタイン種の各脂肪組織における酸化ストレス応答因子の発現を検討した結果、MMP2 及び MMP9 遺伝子の発現が、腸間膜脂肪において黒毛和種がホルスタインより高い傾向にあった。また pref-1 遺伝

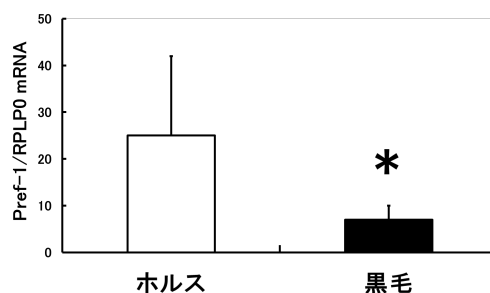


図2. 腸間膜脂肪の pref-1 発現量

子の発現は、腸間膜脂肪においてホルスタインが黒毛和種より有意に高い結果となった(図2)。一方、皮下脂肪では、MMP 並びに pref-1 共に黒毛和種とホルスタイン種に発現に差は認められなかった。これらの結果から、ウシ品種の違いが脂肪組織における酸化ストレス応答に及ぼす影響に関しては、皮下脂肪と比較し腸間膜脂肪での影響が大きい可能性が推察された。ヒトや実験動物においても、皮下脂肪と比較し内臓脂肪では酸化ストレスマーカーの発現が高いことが報告されており、牛品種の違いが酸化ストレスに及ぼす影響に関しても、特に内臓脂肪において酸化ストレス状態が顕著である可能性が推察された。

以上の結果から、脂肪蓄積部位、給与飼料条件、品種差といった要因は牛脂肪細胞における酸化ストレス状態に影響を及ぼし、肥育牛のアディポジェネシス制御において重要な役割を果たしている可能性が推察された。今後、肥育牛におけるアディポジェネシス制御機構を解明していく上で、各脂肪蓄積部位において、脂肪細胞の酸化ストレス状態に着目していく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)

Tomoya Yamada, Mikito Higuchi, Naoto Nakanishi. Fat depot-specific differences in pref-1 gene expression and adipocyte cellularity between Wagyu and Holstein cattle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. '445, 310-313. 2014. doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.177( 査読有)

Tomoya Yamada, Mikito Higuchi, Naoto Nakanishi. Plasma 8-isoprostane concentrations and adipogenic and adipokine gene expression patterns in subcutaneous and mesenteric adipose tissues of fattening Wagyu cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*. 75: 1021-1027.2013. doi: 10.1292/jvms.13-0071 ( 査読有)

〔学会発表〕(計1件)

山田 知哉、樋口 幹人、中西 直人. 黒毛和種肥育牛における飼料中抗酸化ビタミン含量の違いが皮下及び内臓脂肪のアディポカイン遺伝子発現に及ぼす影響. 日本畜産学会第118回大会. 2014年3月28日. つくば国際会議場(茨城県・つくば市).

〔その他〕

山田 知哉. 肥育牛における脂肪組織成長の制御機構. 科学飼料協会第426回月例研究会. 2014年9月27日. 馬事畜産会館(東京都・中央区).

## 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