

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292137

研究課題名(和文)肥育牛脂肪組織における褐色脂肪細胞/Brite細胞分化機構の究明

研究課題名(英文) Exploration of mechanism underlying differentiation to brown/brite adipocytes in fat depots of fattening cattle

研究代表者

松井 徹 (Matsui, Tohru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40181680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ脂肪組織より単離した間質脈管系細胞をBrite細胞に分化させる方法を確立した。その際にレチノイン酸を添加するとBrite細胞特異的に発現するUcp1発現を抑制した。黒毛和種肥育牛をビタミンA制限飼料で飼育しても脂肪組織中のUcp1発現は変化しなかったが、ビタミンA制限牛由来の間質脈管系細胞から分化させたBrite細胞のUcp1発現は、対照牛由来の細胞のUcp1発現よりも若干高かった。

研究成果の概要(英文)：We established culture condition to differentiate stromal-vascular cells originated from bovine adipose tissues to brite (brown in white) adipocytes. Retinoic acid had an inhibitory effect on expression of Ucp1, a gene predominantly expressed in brite adipocytes. Feeding vitamin A-restricted diet did not affect expression level in adipose tissues of Japanese Black fattening cattle. However, Ucp1 expression was slightly higher in brite adipocytes differentiated from stromal vascular cells isolated from vitamin A-restricted cattle than in those from control cattle.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：褐色脂肪細胞 Brite細胞 ウシ ビタミンA

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肥育牛の基礎代謝量（維持のための正味エネルギー量）は、必要とされる全てのエネルギーの 50% を大きく上回ることが多い。白色脂肪細胞におけるエネルギー消費は、それ以外の細胞のエネルギー消費より著しく小さい。そのため、肥育による体脂肪率増加に伴って、体重当たりの基礎代謝量は減少するはずであるが、代謝体重(体重^{0.75})当たりの基礎代謝量は一定であり、体重当たりで示してもわずかに減少するのみである。この結果は、肥育の進行に伴い、基礎代謝が亢進することを示している。
- (2) 濃厚飼料を多給された肥育牛では、絶食時熱生産が増加するが、この増加は、未知の熱生産器官の増加に起因することが示唆されている (*J Anim Sci.* 1991;69:1214-22)。つまり、肥育時には、基礎代謝が亢進するため、エネルギー利用効率は低下する。この問題は、肥育にとって極めて重要である。しかし、肥育により増加する「熱生産器官」の実態は不明である。
- (3) 脂肪細胞には、エネルギーを蓄積する白色脂肪細胞とエネルギーを熱として消費する褐色脂肪細胞がある。褐色脂肪細胞ではこの細胞に特異的な脱共役タンパク質 1 (Ucp1) が発現している。Ucp1 は ATP 生産に使われるべきエネルギーを熱に変える「エネルギー浪費」タンパク質である。
- (4) 褐色脂肪細胞から構成される褐色脂肪組織は、ヒトでは幼児期に存在し、成長に伴い速やかに消滅するとされていたが、成人においても褐色脂肪細胞が存在していることが明らかになった。また、褐色脂肪細胞数には大きな個人差があること、褐色脂肪細胞が少ないヒトは肥満しやすいことも示されている (*Diabetes.* 2009;58:1526-31)。一方、高脂肪食摂取に対する適応として脂肪組織では褐色脂肪細胞が増加し、肥満を部分的に抑える (*J Physiol Biochem.* 2007; 63:317-27)。成人で見出された褐色脂肪細胞は白色脂肪組織に散在するので典型的な褐色脂肪細胞と区別するため Brite (brown in white)、ベージュ (Beige) 細胞と呼ばれている。
- (5) ウシでは、褐色脂肪細胞は出生直後に消失するとされてきた (*J Anim Sci.* 2004;82:942-54, 他)。しかし、研究代表者らは、後期肥育牛の脂肪組織で褐色脂肪細胞特異的な Ucp1 遺伝子が発現しており、濃厚飼料を多給すると Ucp1 遺伝子発現が増加すること、脂肪組織には

Ucp1 陽性で多房性の Brite 細胞が存在していることを明らかにしており (*Gen Comp Endocrinol.* 2013; 184:87-92)。肥育に伴い増加する未知の「熱生産器官」の少なくとも一部は、Brite 細胞であることを示している。

- (6) 0.1 μ M のレチノイン酸は 3T3-L1 など白色脂肪細胞分化を抑制する。同濃度のレチノイン酸はマウス由来の褐色脂肪細胞分化を促進するが、ヒト由来の褐色脂肪細胞分化には影響を及ぼさない (*BMC Cell Biol.* 2013;14:41)。また、短期間のレチノイン酸処理は分化したマウス由来の褐色脂肪細胞の活性を高める (*J Biol Chem.* 1995;270:5666-73)。すなわちレチノイン酸は褐色脂肪細胞の分化促進と活性増強を行うが、この作用は種によって異なる可能性がある。肥育牛では、肉質向上のため広くビタミン A 制限が行われているので、ビタミン A から生じるレチノイン酸が不足する結果、Brite 細胞分化・活性が抑制されている可能性がある。なお、レチノイン酸がマウスのエネルギー消費を増加させることも知られている (*Adipocyte.* 2013;2:184-7)。

2. 研究の目的

- (1) 肥育牛の脂肪組織から調製した間質脈管系細胞（脂肪組織から脂肪細胞を除いた脂肪前駆細胞を含む細胞群）を Brite 細胞へ分化させるために適した条件を確立する。
- (2) レチノイン酸添加が肥育牛 Brite 細胞の分化・活性に及ぼす影響を解明する。
- (3) ビタミン A 制限が肥育牛の脂肪組織における Brite 細胞 (Ucp1 や PRDM16 の発現) ならびに Brite 前駆細胞 (間質脈管系細胞の Brite 細胞への分化) に及ぼす影響を解明する。

3. 研究の方法

- (1) 屠畜場から、肥育牛の皮下脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織を採取する。研究代表者らの方法 (*J Anim Sci.* 1998;76:61-5) にしたがって、これらの脂肪組織より間質脈管系細胞を調製し、Brite 細胞への分化を試みる：上述の方法 (*J Anim Sci.* 1998;76:61-5) にしたがって白色脂肪細胞に分化させる培養条件を含む多様な条件で培養する。また、研究代表者らが用いている継代系褐色脂肪前駆細胞を分化させる条件 (*Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830:5027-35)、3T3-L1 白色脂肪細胞に Ucp1 遺伝子を発現させる条件 (*J Vet Med Sci.* 2014; 76:57-64) を基に、甲状腺ホルモンなどの処理を行う。

- (2) 培地に 0.1 nM から 10 μM のレチノイン酸を添加し、レチノイン酸が Brite 細胞分化に及ぼす影響を検討する。なお、褐色脂肪細胞分化を最も鋭敏に反映する Ucp1 発現をリアルタイム RT-qPCR で測定することにより Brite 細胞への分化を評価する。
- (3) 京都大学農学研究科附属牧場で飼育されている 10 ヶ月齢の黒毛和種去勢牛 12 頭を用いる。6 頭にはビタミン A 制限飼料を給与し、他の 6 頭には対照飼料を給与する。飼育期間中 1 ヶ月ごとに採血を行い、血漿中レチノール濃度を測定する。30 ヶ月齢に達した時点で屠畜し、脂肪組織を採取する。脂肪組織で発現している褐色脂肪細胞の分化指標として用いられている Ucp1 遺伝子発現をリアルタイム RT-qPCR で測定する。
- (4) 各試験牛の脂肪組織から単離した間質脈管系細胞を Brite 細胞に分化させる。脂肪細胞分化ならびに Ucp1 遺伝子発現をリアルタイム RT-qPCR で測定する。

4. 研究成果

- (1) 間質脈管系細胞の単離は腎周囲脂肪よりも皮下脂肪の方が容易であった。
- (2) 黒毛和種去勢牛の皮下脂肪組織より間質脈管系細胞を単離し、コンフルエント後にデキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリン、トログリタゾンで 2 日間処理した後、インスリン、トログリタゾンならびにトリヨードサイロニンで 10 日間処理した。この方法により、褐色脂肪細胞 / Brite 細胞のマーカー遺伝子である Ucp1 発現を最も再現性良く検出できた。
- (3) 褐色脂肪細胞で高発現する Pgc-1α や Cidea の発現もこの処理により高くなった。さらに、フォルスコリン処理は Ucp1 発現を増加させた。したがって、この方法が、ウシ間質脈管細胞を Brite 細胞を分化させるのに最も適した方法と考えられた。
- (4) Brite 細胞分化過程におけるレチノイン酸の存在は、Ucp1 発現の抑制を引き起こした。レチノイン酸は脂肪滴の消失も引き起こしたことから、単に Ucp1 発現を減少させる機能があるだけでなく、脂肪細胞を別の経路の細胞に分化転換させる可能性を示唆した。
- (5) 対照飼料あるいはビタミン A 制限飼料を

20 ヶ月間黒毛和種去勢牛に給与し、30 ヶ月齢で屠畜した。皮下脂肪ならびに腸間膜脂肪中の Ucp1 発現に関して、群間に違いは認められなかった。

- (6) 各個体から皮下脂肪組織由来の間質脈管系細胞を単離し、Brite 細胞へ分化させたところ、対照牛由来間質脈管系細胞から分化した Brite 細胞と比べてビタミン A 制限牛由来間質脈管系細胞から誘導した Brite 細胞の方が若干 Ucp1 発現が高いこと、対照牛由来の Brite 細胞ではフォルスコリンにより Ucp1 発現は亢進した一方、ビタミン A 制限牛由来の細胞ではフォルスコリンに対する応答性が認められないことが明らかになった。
- (7) 以前の研究で得た肥育牛の脂肪組織サンプルの解析を通して、肥育牛の褐色脂肪細胞 / Brite 細胞分化に BMP 経路が関与している可能性を示唆した (*Livestock Sci*, 174: 144. 2015)。
- (8) 予想外なことにウシ筋組織では Ucp1 を発現していることを見出した (*J Anim Sci*, 94: 5097. 2016)。

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 4 件)

- (1) Abd Eldaim MA, Hashimoto O, Ohtsuki H, Yamada T, Murakami M, Onda K, Sato R, Kanamori Y, Qiao Y, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Expression of uncoupling protein 1 in bovine muscle cells. *J Anim Sci*. 94:5097-5104. 2016. doi: 10.2527/jas.2016-0726. (査読有)
- (2) Shigematsu M, Yamada T, Wong YY, Kanamori Y, Murakami M, Fujimoto Y, Suzuki M, Kida R, Qiao Y, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Dietary regulation of Ucp2 and Ucp3 expressions in white adipose tissues of beef cattle. *Can J Anim Sci*. 96:457-460. 2016. doi: 10.1139/cjas-2016-0020. (査読有)
- (3) Funaba M, Yamada T, Hashimoto O, Murakami M, Kanamori Y, Matsui T. Presence of brown/beige adipocytes in adipose tissues of fattening cattle and diet-related changes in their activity. *Proc Jpn Soc Anim Nutr Metab*. 60:85-97. 2016. (査読有)
- (4) Qiao Y, Yamada T, Kanamori Y, Kida R,

Shigematsu M, Fujimoto Y, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Regulatory expression of components in the BMP pathway in white adipose tissue of cattle. *Livestock Sci.* 174: 144-149. 2015. doi: 10.1016/j.livsci.2015.02.008. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 吉岡秀貢・糸山恵理奈・北村祥子・長瀬祐士・村上弘明・星野洋一郎・松井 徹・黒毛和種去勢肥育牛におけるビタミンAコントロールが肉質に及ぼす影響について. 総合技術研究会 2017 東京大学. 2017.3.9. 東京大学(東京)
- (2) Funaba M, Yamada T, Hashimoto O, Murakami M, Kanamori Y, Matsui T. Presence of brown/beige adipocytes in adipose tissues of fattening cattle and diet-related changes in their activity. 17th AAAP Animal Science Congress. 2016.8.23. Kyushu Sangyo University (Fukuoka).
- (3) 喬 宇航・村上 賢・友永省三・舟場正幸・松井 徹・黒毛和種去勢牛の脂肪組織由来間質脈管系細胞から分化誘導した脂肪細胞は Ucp1 を発現する. 第 121 回日本畜産学会. 2016.3.29. 日本獣医生命科学大学(武蔵野)
- (4) Wong YY, 山田知哉・金森耀平・重松芽衣・富士本有祐・木田龍祐・喬 宇航・友永省三・舟場正幸・松井 徹・肥育牛脂肪組織では給与飼料によって Ucp2,3 発現が変化する. 第 65 回関西畜産学会. 2015.9.4. 愛媛大学(松山)
- (5) 喬 宇航・山田知哉・金森耀平・木田龍祐・重松芽衣・富士本有祐・友永省三・舟場正幸・松井 徹・ウシ白色脂肪組織中における TGF-β ファミリーの発現. 第 64 回関西畜産学会大会. 2014.9.8. 広島大学(東広島)

〔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(計0件)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 徹 (MATSUI, Tohru)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：40181680

(2) 研究分担者

友永省三 (TOMONAGA, Shozo)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：00552324