

## 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 6 月 1 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：21590144

研究課題名（和文）環境因子・ストレスが脂肪細胞の形態とアディポカイン分泌に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of environmental stresses on the form of adipocytes and adipokine secretion

研究代表者 佐藤 政男（SATO MASAO）

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：20045743

研究成果の概要（和文）：拘束ストレス、カドミウムなどは、正常な形態である脂肪細胞小型化させるにも拘わらず、インスリン感受性亢進性アディポネクチン減少（時に増大）や感受性低下性レジスチン、腫瘍壊死因子を増大させた。インスリン耐性をもたらす。肥満時と異なり脂肪細胞の形態と分泌の関係は脂肪細胞サイズによって規定されなかった。さらに脂肪細胞の形態変化には脂肪細胞肥大化因子メストや分化制御分子 PPAR $\gamma$  が関与することが示された。

研究成果の概要（英文）： We showed that exposure to restraint stress, cadmium and cobalt caused reduction of size of adipocytes causing normal size. However, expression of adiponectin decreased in adipocytes with Cd-treated mouse and cells, whereas the expression of resistin and TNF- $\alpha$  increased in adipose tissue treated with restraint stress, causing a variety of diseases such as insulin resistant. The data suggest that size of adipocytes is not always correlated with adipokine secretion, different from obesity. Changes in the size of adipocytes may be correlated with the gene expression of adipocyte enlargement factor: *Mest* and differentiation factor: *PPAR $\gamma$* .

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 円	450,000 円	1,950,000 円
2010年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2011年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：脂肪細胞、アディポカイン、メタロチオネイン、カドミウム、メスト

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は脂肪細胞の数の増加と脂肪の過剰取り込み状態である。遺伝的には、インターロイキン-6 の遺伝子欠損 (Wallenius et al. *Nature Med.*,2002)マウスが肥満となる。肥満を基盤として高血糖、低 HDL、高血圧を合併し、糖尿病や血管障害などの発症リスクは増大する。しかし、日本人は欧米人に比べ高度肥満でないが、糖尿病患者が多く、単なる過剰エネルギー摂取では説明できず、多種要因が考えられるが詳細は不明である。日本人が日常的に継続負荷される要因の解析が必要である。

脂肪組織は単なる脂肪貯蔵ではなく、アディポカイン分泌組織である。肥満から糖尿病へ進行は、(1)小型脂肪細胞はインスリン感受性亢進性アディポネクチンを多く分泌し、感受性低下性レジスチンや腫瘍壊死因子分泌を抑制するが、肥大化脂肪細胞は相対分泌バランスが崩壊による (Maeda et al., *Nature Med.*,2002)、(2) 肥満マウスは小胞体ストレスとなり糖尿病を発症する (Ozcan et al., *Science*, 2006) ことが明らかにされ、生活習慣病研究は新たな段階を迎えた。

カドミウム毒性を解毒する金属結合たんぱく質メタロチオネインが、小胞体ストレス (Kondoh et al., *Toxicol.Lett.*,2004) 及び、高脂肪食摂取による肥満を抑制する(Sato et al., 2010) し肥満防止の糸口となる。日本人が日常的負荷が多い要因として、過度のストレスや食品中カドミウムがあげられ、実際、外国人に比較し日本人の腎臓カドミウム濃度は数倍高い。更に、高カドミウム濃度にも拘わらず、メタロチオネイン濃度が低い毒性に高感受性となるリスク集団が存在する (Yoshida et al., *Bio.Trace Elem.Res.*, 1998)。より低濃度カドミウムによる障害発現検討の必要がある。そこで環境因子として、精神的ストレスやカドミ

ウムが脂肪組織に影響し、メタボリックシンドローム後の増悪化に關与する可能性を研究した。

## 2. 研究の目的

全身性精神的ストレス、カドミウムが、(1) 脂肪細胞の形態・分泌機能への影響、(2) 脂肪細胞の分化、肥大化の影響する過程、(3) インスリン感受性の亢進性と低下性アディポカイン分泌バランス、(4)肥大化脂肪細胞からのアディポカイン分泌に与える作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(実験 1) マウスを①正常食群、②ストレス負荷群に分け、50ml チューブ中の拘束ストレス、テイルピンチを 10 分/日を 2 週間負荷後、白色脂肪組織、血液や肝臓を採取した。

(実験 2) 雄性 8 週齢 ICR マウスに 0, 5, 10, 20 $\mu$ molカドミウム/kg 体重, 3.5 回/週を 2 週間皮下投与し、白色脂肪組織を摘出した。

(実験 3) メタロチオネイン欠損マウスに 0.5, 0.75mg カドミウム/kg を 7 日間皮下投与後白色脂肪組織を摘出した。

(実験 4) 生後 5-7 日後、雌性マウスの背側部から皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ液処理、脂肪細胞分画を回収した。これを天井培養し、増殖細胞を 10 回以上継代を繰り返し株化し前駆脂肪細胞株として使用した

(測定) コルチコステロン、インスリンは ELISA 法、アディポネクチン、レプチン、レジスチン、腫瘍壊死因子の 遺伝子発現量を RT-PCR 法で解析した。ヘマトキシリン・エオシン染色法で脂肪細胞面積を測定した。

## 3. 研究成果

(1) 精神的ストレス (拘束ストレス) の脂肪組織への影響

①現代はストレス社会であり、様々な疾病にストレスが關与するとされる。しかし、精神

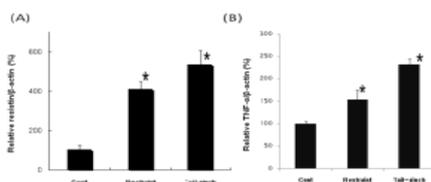
的と身体的ストレスが複合する実際の生活環境ストレスと生活習慣病との関係が実証された報告例は極めて少ないので、ストレス白色脂肪組織への影響を検討した。

②血清中コルチコステロンはわずかに増大しストレス状態であった。血糖値、血中インスリン、中性脂肪は生活環境ストレス負荷による影響はなかった。

③肝臓重量は変化がなく、下腹部白色脂肪量は有意に減少した。白色脂肪重量減少は生活環境ストレスによる疲弊で、ストレスに対し脂肪組織は感受性が高いことが示された。

④白色脂肪組織における、環境ストレスによりインスリン抵抗性惹起因子（レジスチン、腫瘍壊死因子）と抵抗性改善因子（アディポネクチン）の上昇が観察された(図 1A,B,C)。

(A) レジスチン (B) 腫瘍壊死因子



(C) アディポネクチン

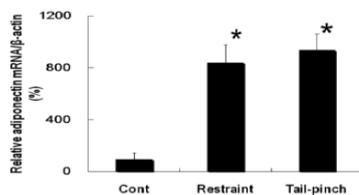


図1. 白色脂肪組織での繰り返し拘束ストレス、尾クレンメ処置 (10 分/日、2週間) の(A) 腫瘍壊死因子、(B) レジスチン、(C) アディポネクチン遺伝子発現への影響

⑤以上の結果から、高脂肪食摂取時におこる白色脂肪重量の増加と生活環境ストレスによる白色脂肪重量の減少は相反するが、両者とも白色脂肪組織に質的变化をもたらし、また、高度肥満時に起こるインスリン抵抗性惹起因子遺伝子発現亢進が、短期間ストレスよ

っても起きることも示している。環境要因は白色脂肪組織に質的变化を及ぼすことで、生活習慣病に関与することが示唆された。

(2) カドミウムによる脂肪組織への影響

①インスリン抵抗性や動脈硬化促進の一因として、脂肪細胞の肥大化がある。脂肪細胞縮小化は、肥満による疾病を防止する。日本では肥満を伴わない糖尿病患者もおり、その機序解明のうえで脂肪細胞サイズと機能変化を調べることは重要である。遺伝的素因に加え食品からの摂取量が多いカドミウム曝露が脂肪重量、脂肪細胞サイズとアディポカイン発現と分泌への影響を検討した。

②マウスではカドミウム曝露は脂肪組織量の用量依存的な減少および細胞面積を縮小化させた。白色脂肪組織重量の減少が見られたのに対し、肝臓では影響が見られず(図 2)、脂肪組織のカドミウムに対する感受性は高かった。

③白色脂肪中カドミウム濃度は投与により増大したが肝臓と比較し非常に低い。細胞中では脂肪部分を除くとより高濃度で作用すると考えられる。メタロチオネイン-I (MT-I) 遺伝子はカドミウム濃度に依存し増大した(図 2)。カドミウム投与群は対照群に比べ脂肪細胞サイズは投与量に依存して減少した(図 3)。前駆脂肪細胞から小型脂肪細胞の分化、増殖期を制御する PPAR $\gamma$  や c/EBP の遺伝子発現は減少傾向に、さらに小型成熟脂肪細胞から脂肪を取り込み肥大化型脂肪細胞とするメスト遺伝子発現は有意に減少し、カドミウムは脂肪取り込み段階に作用する。

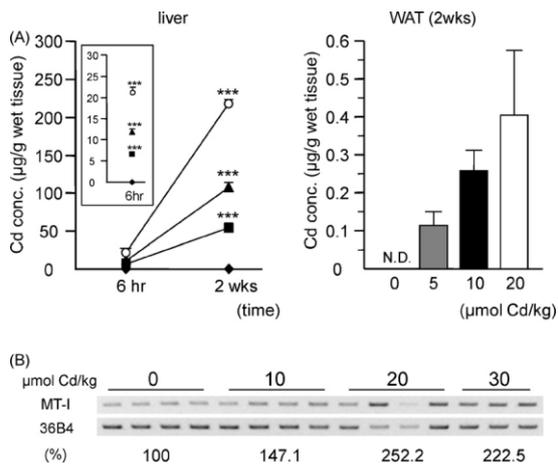


図 2. (A)カドミウム投与後の肝臓、白色脂肪組織濃度、▲: 対照群; ■: 5µmol カドミウム/kg; ▲: 10µmolカドミウム/kg; ○: 20µmolカドミウム/kg. (B) 投与6時間後メタロチオネイン-I 遺伝子発現度

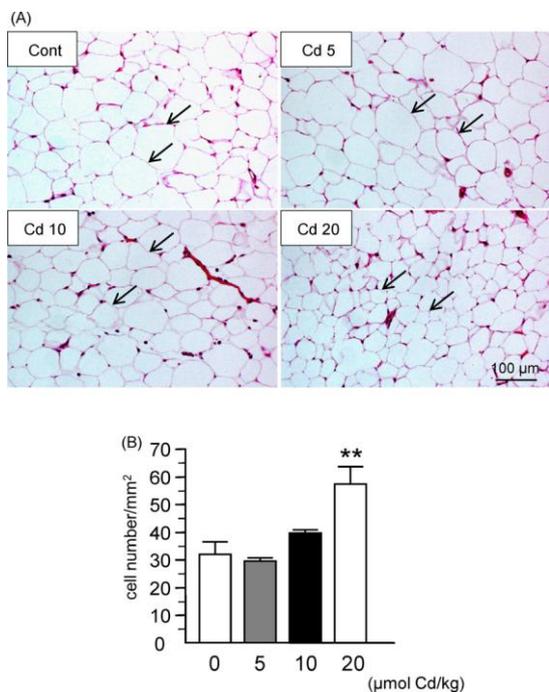


図3. 繰り返しカドミウム投与後のマウス白色脂肪組織の組織像(A) 対照群(Cont), 5µmolカドミウム/kg (Cd 5), 10µmol (Cd 10), 20µmol (Cd 20). (B) 脂肪細胞数

(3) 金属が脂肪細胞に影響を及ぼす可能性

①高脂肪食は脂肪細胞を肥大化させたが、ヒ素、マンガンおよびコバルト処理は肥大化脂肪細胞を標準食時の大きさまで縮小化させた。一方、水銀は著しい縮小化を示した。

各金属は、高脂肪食摂取により増加した血中トリグリセリド、遊離脂肪酸 (FFA)を低下させた(表 1)。また、コバルトは血中 LDLを低下させ、さらに HDL の有意な増加、肥大化脂肪細胞を正常サイズに回復させると同時に脂質代謝異常の改善効果を示した。

表 1. 高脂肪摂取のコバルト、水銀、マンガンとヒ素の血中脂肪成分への影響

	STD	HFD	As	Hg	Mn	Co
TG*(mg/dl)	95	132	106*	98*	104*	103*
FFA (mEq/L)	1.07	1.27	1.26	1.23	1.04*	1.02*
HDL(mg/dl)	59	62	62	59	66	81*
LDL (mg/dl)	30	54	38*	43*	37*	30*

STD:標準食、HFD:高脂肪食、TG:中性脂肪、FFA:遊離脂肪酸、HDL:高密度リポタン、LDL: 低密度リポタン

(4) メタロチオネイン遺伝子欠損 (MT<sup>-/-</sup>) マウスにおけるカドミウムの脂肪細胞縮小効果発現とアディポカイン分泌への影響

①カドミウムの毒性抑制作用を有するメタロチオネインの欠損マウスを用い、カドミウムの脂肪細胞へ直接作用するかを解析した。

②カドミウム曝露によりメタロチオネイン欠損マウスは体重・脂肪重量の減少が認められたが、野生型マウスは対照群と比較し差はなかった。

③カドミウム連続曝露後にメタロチオネイン欠損マウスでは、対照群と比較し脂肪細胞の小型化が認められ、一視野中の脂肪細胞数は増大した(図 3)。野生型マウスでは、脂肪細胞サイズ変化はなかった。

④カドミウム曝露によりマクロファージマーカー陽性細胞数は、メタロチオネイン欠損マウスでは対照群と比較してマクロファージ

ジのカドムウム増加が観察された。しかし、野生型マウスでは増加は認められなかった。⑤カドムウム連続曝露による脂肪細胞の形態に関連する遺伝子への影響を検討すると、両系統マウスで、カドムウム曝露により、PPARv2 及び脂肪取り込みに関与し脂肪細胞のサイズに関連するメスト遺伝子発現量の有意な低下した。

野生型マウスでは組織学的には変化がなかったが、PPARv2 およびメスト遺伝子発現やレプチン発現の変動が認められた。⑥メタロチオネイン欠損マウスへのカドムウム連続曝露によりアディポネクチン遺伝子発現量の減少傾向が認められた。また、レプチン遺伝子発現量は両系統マウスにおいて対照群と比較して有意な減少が認められた。アディポネクチンとレプチンの血中濃度を測定したところレプチンは血中において両系統とも用量依存的に減少した (図 4)。

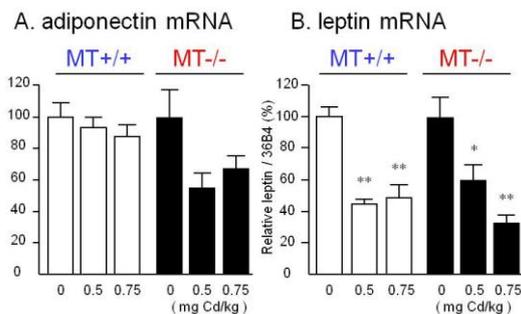


図 4 野生型、メタロチオネイン欠損マウスにおけるカドムウム 1 週間投与後の(A)アディポネクチン、(B)レプチン遺伝子発現

(5) メスト遺伝子を発現しうる脂肪細胞のモデル系作製と影響因子の検索

①食餌性・遺伝性肥満モデル脂肪組織で著しく発現増大し、脂肪細胞肥大化促進因子とされるメスト遺伝子発現は、細胞では容易に起こらず発現制御解析が困難なので、前駆脂肪細胞株を樹立した。

②脂肪細胞分化誘導時におけるメスト遺伝子発現量は、脂肪細胞分化誘導後 1 日目より

増大し、3 日目に約 6 倍の発現増大ピークが認められ (図 5)、13 日にかけ減少したが、さらに 21 日に再び増大した。

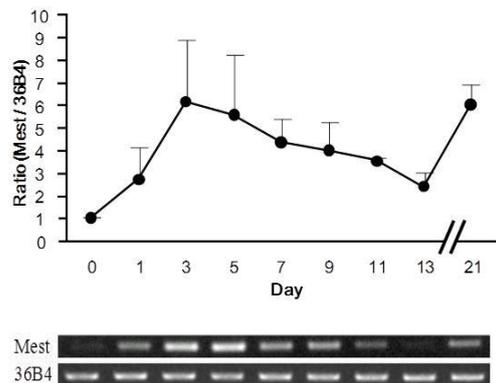


図 5. マウス前駆脂肪細胞株におけるメスト遺伝子発現の経時的変化

③前駆脂肪細胞株でメスト遺伝子発現量は、cAMP 類似体;8-ブromo-cAMP 処理により有意に増大した。一方、分化誘導混合剤によるメスト遺伝子の発現上昇は、たんぱくリン酸化酵素阻害剤前処理により抑制され、メスト遺伝子発現が cAMP/たんぱく質リン酸化酵素経路により、調節されることが示された。

④樹立前駆脂肪細胞株で、メストの発現は分化初期と成熟後に増大し、脂肪細胞生成期と肥大化時期の発現が示された。これは、雌性メタロチオネイン欠損マウスは弱齢期と高脂肪食摂取による肥満期に発現増大したことと一致し(Sato et al., FASEBJ 2010)、動物の肥満形成過程のモデルとなると考えられる。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- (1) Kadota Y, Yanagawa M, Nakaya T, Kawakami T, Sato M, Suzuki S. Gene expression of mesoderm-specific transcript is upregulated as preadipocytes differentiate to adipocytes in vitro. J Physiol Sci. *in press*, 査読あり
- (2) Kawakami T, Hanao N, Nishiyama K,

- Kadota Y., Inoue M, Sato M., Suzuki S.,  
Differential effects of cobalt and mercury on  
lipid metabolism in the white adipose tissue of  
high-fat diet-induced obesity mice, *Toxicol.*  
*Appl. Pharmacol.*, 258, 32-42, 2012, 査読あり
- (3) Sato M., Ishibashi S., Higashimoto M.,  
Kadota Y., Kawakami T., Suzuki S., Early  
changes induced by environmental stresses in  
insulin sensitivity-related genes, *Eur. J.*  
*Pharmacol.*, 668, 472-476, 2011, 査読あり
- (4) Cadmium reduces adipocyte size and  
expression levels of adiponectin and  
Peg1/Mest in adipose tissue. Kawakami T,  
Sugimoto H, Furuichi R, Kadota Y., Inoue M,  
Setsu K, Suzuki S, Sato M. *Toxicology*,  
267(1-3): 20-26. 2010, 査読あり
- (5) Development of high-fat-diet-induced obesity  
in female metallothionein-null mice, M Sato,  
T. Kawakami, M. Kondoh, M. Takiguchi, Y.  
Kadota, S. Himeno, S. Suzuki., *FASEB J.*, 24,  
2375-2384, 2010. 査読あり

[図書] (計 2 件)

[著書・訳書]

- (1) 佐藤政男、丸善(株)出版、『食品安全  
ハンドブック』、第 7 章生体有害金属、カド  
ミウム, 120-122, 2010,
- (2) 佐藤政男、南江堂、「衛生薬学」、序章：  
衛生薬学とは、IV 保健衛生、V I 章化学物質  
と生態系、2011

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 門田佳人、柳川真澄、佐藤政男 (5 番目、  
全 6 名)、脂肪細胞関連遺伝子 Mest は脂  
肪細胞分化時に発現が増大する 日本薬  
学会第 131 回年会 2012 年 3 月 札幌
- (2) 川上隆茂、花尾憲秀、西山佳織、門田佳  
人、佐藤政男、鈴木真也 正常および肥  
大化脂肪組織に対する金属の脂質蓄積お  
よびエネルギー代謝への影響 メタロチ

オネイン及びメタルバイオサイエンス研  
究会 2011 年 12 月 名古屋

- (3) 佐藤政男、“肥満制御”研究からみえるメ  
タロチオネインの生理的作用、メタロチ  
オネイン及びメタルバイオサイエンス研  
究会 2011 年 12 月 名古屋
- (4) 川上隆茂、田中惇一、西山佳織、門田佳  
人、佐藤政男 (5 番目、全 6 名) メタロ  
チオネイン欠損マウス由来脂肪細胞株  
を用いた脂肪細胞レベルでのカドミウ  
ムの影響解析 メタロチオネイン及び  
メタルバイオサイエンス研究会 2011 年  
12 月 名古屋
- (5) 門田佳人、柳川真澄、佐藤政男 (5 番目、  
全 6 名) 脂肪細胞肥大化促進遺伝子 Mest  
のマウス培養脂肪細胞分化誘導時におけ  
る発現変動に関する、2011 衛生薬学・環境  
トキシコロジー 2011 年 10 月 金沢
- (6) 川上隆茂、西川裕、高崎智士、門田佳人、  
佐藤政男 (5 番目、全 6 名) メタロチオ  
ネイン欠損マウスを用いた高脂肪食摂  
取に対する肥満発症の性差発現メカニ  
ズム解析、メタロチオネイン及びメタル  
バイオサイエンス研究会 2011 年 12 月  
名古屋
- (7) 西山佳織、川上隆茂、門田佳人、佐藤  
政男 (5 番目、全 6 名) 脂肪細胞機能低  
下に対するカドミウムイオンの直接作  
用の可能性 日本薬学会第 131 回年会  
2011 年 3 月 静岡

[ホームページ]

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab/lab11/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
佐藤 政男 (SATO MASAO)  
徳島文理大・薬学部医療薬学科・教授  
研究者番号：20045743
- (2) 研究分担者  
門田 住人(KADOTA YOSHITO)  
徳島文理大・薬学部医療薬学科・准教  
研究者番号：60461365