

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 4 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590257

研究課題名（和文）

中鎖脂肪酸による筋固有熱産生機構：中鎖脂肪酸の筋特異的受容体の同定

研究課題名（英文）

Medium chain fatty acid regulates uncoupling protein 3 expression in skeletal muscle

研究代表者

二川 健（NIKAWA TAKESHI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20263824

研究成果の概要（和文）：

本研究において、中鎖脂肪酸は、骨格筋の uncoupling protein (UCP) 3 の発現を増大するだけでなく、pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 4 の発現を特異的に上昇させることを発見した。さらに、FATP1 が中鎖脂肪酸の受容体となり、細胞内に取り込まれ、その後中鎖脂肪酸は核内で PPAR δ のリガンドとして UCP3 の発現調節に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Long chain fatty acids are incorporated into chylomicrons and transported through lymph, whereas medium chain fatty acids which are transported in the portal blood directly to the liver and are consumed as energy immediately. However, the role of medium chain fatty acids on energy expenditure in skeletal muscle was unclear. In the present study, we found that the expression of uncoupling protein 3 (UCP3) and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) was increased in medium chain fatty acid-treated muscle cells. The uptake of medium chain fatty acids in FATP1-transfected cells significantly increased, compared with that in mock-transfected cells. Furthermore, the expression of UCP3 induced by medium chain fatty acid was blocked with GSK0660, a selective PPAR- δ antagonist, in muscle cells. These findings suggest that medium chain fatty acids protect the obesity by a mechanism that may involve in the expression of UCP3 in skeletal muscle, resulting in increased thermoregulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：栄養生理学、中鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

肥満は、糖尿病などのメタボリックシンドロームの発症原因である。肥満を防ぐためには、適度な運動や食事(特に脂質)の制限が効果的であるが、ストレス社会の現代ではこれらを実行できている人々は少ない。申請者らは、食事制限以外の栄養法による抗肥満について研究を行ってきた(Hirasaka et al. *Diabetes*, 2007)。この研究を通して、著明な抗肥満効果のある不飽和脂肪酸や中鎖脂肪酸(炭素長が8~12個の脂肪酸)がマクロファージの脂肪組織への浸潤を抑制することを見出した。加えて、中鎖脂肪酸は実験動物の体温を異常に高めることを発見した。中鎖脂肪酸は消化管内で速やかに吸収され、食後の熱産生を増大させる。このようにすぐにエネルギー源として使われてしまうために血中には存在しないと考えられてきたが、血中にも中鎖脂肪酸が微量存在することを見出した。中鎖脂肪酸は、骨格筋でのUCP3の発現を高め、余分なエネルギーを熱に変換しているため、抗肥満効果を示していることが強く示唆された。UCP3発現を制御する栄養素はこれまで発見されておらず、中鎖脂肪酸は新規の熱産生制御因子(Thermoregulator)であることがわかった。本研究では、中鎖脂肪酸を抗肥満効果のある新規食品素材として開発することを目的としている。この目的を遂行するために、中鎖脂肪酸によるUCP3の発現制御機構を明らかにし、その効用を科学的に証明する。

2. 研究の目的

近年、肥満は世界的に広まりつつあり、重大な健康問題として注目されている。遺伝的要因または環境的要因などが複雑にからまって肥満は進行し、さらに進展するとインスリン抵抗性を引き起こす。さらにインスリン抵抗性は、最終的にII型糖尿病だけでなく高血圧、脂質代謝異常などの病態が重複したメタボリックシンドロームをも引き起こす。肥満におけるインスリン抵抗性を引き起こす主な因子の1つとして考えられているのが、長鎖飽和脂肪酸である。過剰となったパルミチン酸やステアリン酸のような長鎖飽和脂肪酸は、細胞内に蓄積されることでJNKやPKC θ といったセリン・スレオニンキナーゼの活性化を介してインスリン抵抗性を引き起こすことが知られている。つまり、長鎖飽和脂肪酸を特に多く含む食事である欧米風の食事などは肥満を強く誘導し、最終的にはインスリン抵抗性の主要因と考えられている。しかし、高脂肪食全てが必ずしも肥満を誘導するわけではなく、食事の脂肪酸の質も重要なリスクファクターの1つである。

肥満を誘導しにくい脂肪酸であると注目

されているのが、中鎖脂肪酸である。一般的に中鎖脂肪酸とは、炭素数が8から12個の脂肪酸のことを指し長鎖脂肪酸と異なり水溶性が高いため小腸で吸収された後に門脈を経て直接肝臓へと運搬される。そして、速やかに β 酸化によって消費されるために、中鎖脂肪酸は体脂肪として蓄積されにくいと考えられてきた。さらに中鎖脂肪酸は体に蓄積しにくいだけでなく長鎖脂肪酸と比較して、個体レベルにおいてエネルギー消費量を増大させることや、食事誘導性熱産生を増大させることが知られている。この現象は、体脂肪量の減少によるものであると報告があるが、近年、骨格筋におけるミトコンドリアの脂肪酸酸化能の増大が大きく関与していることが明らかになってきた。

骨格筋において脂肪酸酸化能を制御する因子として、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α , δ (PPAR α , δ)がある。PPAR α , δ は、オレイン酸などの特に長鎖不飽和脂肪酸をリガンドとし、リガンドが結合することで核移行して脂肪酸代謝に関与する因子の転写を増大させる核内受容体の1つである。その標的遺伝子の中でも uncoupling protein 3 (UCP3)及び、pyruvate dehydrogenase kinase4 (PDK4)が骨格筋において脂肪酸酸化を増大させる。

本研究では、中鎖脂肪酸など栄養素による筋固有の熱産生活性化経路を明らかにする。具体的には、中鎖脂肪酸の骨格筋特異的な受容体を同定し、取り込まれた中鎖脂肪酸がどのようにUCP3遺伝子の発現を調節しているかについて明らかにする。

3. 研究の方法

【動物実験】

C57BL/6J マウス(SLC,Japan)のオスを21~25°C、12時間の明暗サイクル下で飼育し、自由に食事と水分を摂取することができる。8週齢のオスのマウスにエネルギーの10%が脂質、20%が蛋白質、70%が糖質である普通食(オリエンタルイースト、東京、日本)、全エネルギーの60%がラードである長鎖脂肪酸を多く含む高脂肪食または全エネルギーの50%が中鎖脂肪酸油(C8:0:C10:0=3:1)、10%がラードである中鎖脂肪酸を多く含む高脂肪食を6週間与えた。

【細胞培養、脂肪酸処理及びアンタゴニスト処理】

マウス骨格筋由来細胞であるC2C12筋管細胞(大日本住友製薬、日本、大阪)を37°C、5%CO₂の条件下で増殖培地[100 µg/ml ストレプトマイシン、100 IU/ml ペニシリンGと10%牛胎児血清(FCS)を含む Dulbecco's

modified Egal's medium (DMEM)]で培養した。C2C12 筋芽細胞が 95%コンフルエントになったところで 2% horse serum を含む DMEM に交換し、分化させた。その 72 時間後、脂肪酸培地[600 μ M 脂肪酸(オレイン酸、パルミチン酸、カプリン酸、カプリル酸)と 100 μ M BSA、0.4%エタノール]を分化した C2C12 細胞に添加し、24 時間反応させた。アンタゴニストは、GW6471 (Sigma)及び GSK0660 (Tocris Bioscience)を DMSO (Wako)に溶かし、脂肪酸と同時に処理した。

【リアルタイム RT-PCR 法】

SYBR Green dye を使い、ABI 7300 リアルタイム PCR システム(Applied Biosystems, Foster City, CA)にて、PCR をおこなった。

【ミトコンドリアの抽出と免疫プロット法】

ミトコンドリアは C2C12 筋管細胞から以下のように抽出した。C2C12 筋管細胞を CPT1 緩衝液 (100 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, and 2 mM EGTA, pH 7.4, 4°C)にて回収し、10,500 x g で 10 分間遠心した後、沈殿を回収し、lysis buffer で抽出した。抽出した蛋白質を SDS 化後、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行い、ゲル中の蛋白質を polyvinylidene difluoride (PVDF)膜 (BIO-RAD)に転写した。その後、PVDF 膜を 4%精製ミルクカゼイン (大日本住友製薬)で 1 時間ブロッキングし、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-T)で洗浄した。次に、PVDF 膜を 1 次抗体と 4°Cで一晩反応させた。PBS-T で洗浄後、2 次抗体と 37°Cで 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、抗体と反応した蛋白質を検出した。PVDF 膜はその後 Coomassie Brilliant Blue (CBB)染色を行った。今回使用した抗体は、抗 UCP3 抗体と抗 PDK4 抗体 (Abcam)である。

【その他の生化学指標の測定】

蛋白質濃度はビシニコニン酸 (BCA)法を用いて測定した。

【統計処理】

すべてのデータは SPSS ソフトを用いて分散分析で統計学的に評価し、平均 \pm 標準偏差で表した。有意差は Duncan's multiple range test で検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

【C2C12 筋管細胞における脂肪酸添加による UCP3 発現量への影響】

マウス骨格筋由来筋芽細胞 C2C12 を筋管細胞へと分化誘導したものに中鎖脂肪酸を処理し、回収した mRNA を RT-リアルタイム PCR 法によって解析した。その結果、脂肪酸

酸化を促進する因子であると考えられているミトコンドリア内膜に存在する脱共役蛋白質である UCP3 の発現が有意に増大していたことが分かった (図 1A)。このことは中鎖脂肪酸が骨格筋において脂肪酸酸化亢進作用を有している可能性を示している。さらに脂質・糖代謝の鍵酵素として働く pyruvate dehydrogenase kinase4 (PDK4)の発現についても同様に検討した。興味深いことに長鎖脂肪酸であるオレイン酸 (C18:1)は PDK4 の発現増大を強く誘導することに対し、中鎖脂肪酸 (C8:0, C10:0)はほとんど発現増大を誘導しなかった (図 1B)。次に、免疫プロット法を用いて脂肪酸添加による蛋白質レベルでの UCP3 の発現量への影響を検討した。すると、リアルタイム RT-PCR 法の結果と同様の結果

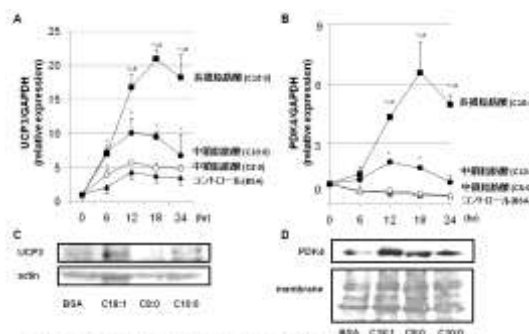


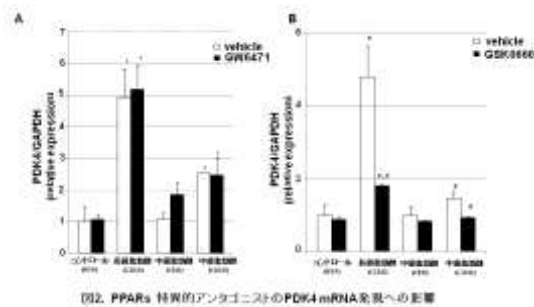
図1. C2C12筋管細胞における中鎖脂肪酸によるPPAR α 発現調節因子の発現調節が得られた。

【PPAR α 特異的アンタゴニストの UCP3 mRNA 発現への影響】

PPARs のリガンドとなりうる主な脂肪酸の特徴は、炭素鎖が比較的長いもので不飽和結合を有する脂肪酸であるとされている。そこでカプリン酸が PPARs の活性化を介して UCP3 や PDK4 の発現調節を行っているかどうかを、PPAR α の特異的アンタゴニストである GW6471 を用いて実験を行った。GW6471 を終濃度が 2.4 μ M となるようにそれぞれの脂肪酸と同時に処理し、PDK4 mRNA の発現量について検討した。しかし、GW6471 添加はオレイン酸とカプリン酸による PDK4 mRNA 発現増大を抑制できなかった。(Fig.2A)

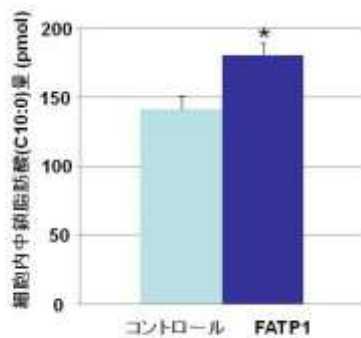
【PPAR δ 特異的アンタゴニストの UCP3 mRNA 発現への影響】

GSK0660 は PPAR δ の特異的アンタゴニストであると報告されている。先ほどと同様に GSK0660 終濃度が 1.2 μ M となるようにそれぞれの脂肪酸と同時に C2C12 筋管細胞に処理し、PDK4 mRNA の発現量について検討した。すると、オレイン酸とカプリン酸による PDK4 mRNA の発現が有意に抑制された。(Fig. 2B)



【中鎖脂肪酸の細胞内取り込み】

中鎖脂肪酸と結合する受容体を検討したところ脂肪酸輸送体である FATP1 を見出した。そこで、FATP1 を強発現した細胞を用いて、中鎖脂肪酸の細胞内取り込み能について検討した。FATP1 を強発現した細胞は empty vector (コントロール) を強発現した細胞と比較して、およそ 20%、¹⁴C でラベルした中鎖脂肪酸 (C10:0) の取り込み能が増大した (図 3)。これらの結果は骨格筋において、FATP1 が中鎖脂肪酸の受容体となり、細胞内に取り込まれ、その後中鎖脂肪酸は核内で PPAR δ のリガンドとして UCP3 の発現調節に関わっていることが示唆された。

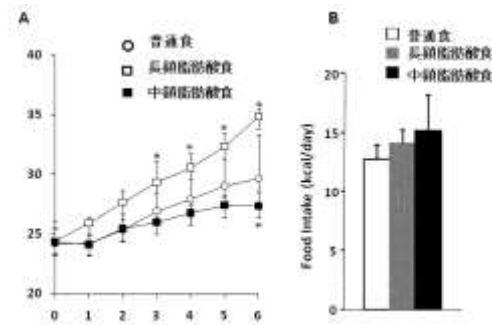


【中鎖脂肪酸を多く含む高脂肪食摂取によるマウスの体重変化への影響】

これまで得られた結果より、中鎖脂肪酸は UCP3 の発現を調節することにより、熱産生を高め、抗肥満効果を示すことが考えられる。最後に、8 週齢のオスの C57BL/6J マウスに 6 週間普通食および長鎖脂肪酸だけの高脂肪食、中鎖脂肪酸を多く含む高脂肪食をそれぞれ与え、体重変化について検討した。すると長鎖脂肪酸のみを含む高脂肪食を摂取したマウスは普通食を摂取したマウスに比べて、体重が有意に増大していた (Fig. 4A)。一方、中鎖脂肪酸を多く含む高脂肪食を摂取した群では、普通食と同程度まで体重の増加が抑えられていた (Fig. 4A)。次に、高脂肪食群間での体重増加量の差が、摂食量の差によるものであるかどうかを検討した。しかし、高脂肪食間で摂取エネルギー量および摂取量に

差は認められなかった (Fig. 4B)。

以上の結果は、中鎖脂肪酸が骨格筋において脂肪酸酸化を亢進し、脂肪酸燃焼を増大することで体に脂肪として蓄えられるエネルギーを熱に変換し、抗肥満作用を發揮している可能性を示す。ゆえに、中鎖脂肪酸は脂肪酸酸化を亢進する抗肥満効果のある新しい機能を持った栄養素であると考えられる。



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 11 件)

1. Kohno S, Ueji T, Abe T, Nakao R, Hirasaka K, Oarada M, Harada-Sukeno A, Ohno A, Higashibata A, Mukai R, Terao J, Okumura Y, Nikawa T. Rantes secreted from macrophages disturbs skeletal muscle regeneration after cardiotoxin injection in Cbl-b-deficient mice. *Muscle Nerve*. 査読有、2011; 43(2):223-229、DOI: 10.1002/mus.21829.
2. Hirasaka K, Lago CU, Kenaston MA, Fathe K, Nowinski SM, Nikawa T, Mills EM. Identification of a redox-modulatory interaction between uncoupling protein 3 and thioredoxin 2 in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxid Redox Signal*. 査読有、2011; 15(10):2645-2661、DOI: 10.1089/ars.2011.3888.
3. Matsugaki T, Shiba N, Kohno S, Nikawa T, Hirasaka K, Okumura Y, Ishidoh K, Soejima T, Yoshimitsu K, Nagata K. "Hybrid exercise" prevents muscle atrophy in association with a distinct gene expression pattern. *Kurume Med J*. 査読有、2011; 57(4):101-108、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778671>
4. Oarada M, Tsuzuki T, Nikawa T, Kohno S, Hirasaka K, Gono T. Refeeding with a high-protein diet after a 48 h fast causes acute hepatocellular injury in mice. *Br J Nutr*. 査読有、2011; 1-10、

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21902856>
5. Oarada M, Igarashi M, Tsuzuki T, Kamei K, Hirasaka K, Nikawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Gono T. Effects of a high-protein diet on host resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読有、2010; 74(3):620-626
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208341>
 6. Mikura M, Yamaoka I, Doi M, Kawano Y, Nakayama M, Nakao R, Hirasaka K, Okumura Y, Nikawa T. Glucose infusion suppresses surgery-induced muscle protein breakdown by inhibiting ubiquitin-proteasome pathway in rats. *Anesthesiology*. 査読有、2009; 110(1):81-88
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104174>
 7. Hemdan DI, Hirasaka K, Nakao R, Kohno S, Kagawa S, Abe T, Harada-Sukeno A, Okumura Y, Nakaya Y, Terao J, Nikawa T. Polyphenols prevent clinorotation-induced expression of atrogenes in mouse C2C12 skeletal myotubes. *J Med Invest*. 査読有、2009; 56(1-2):26-32
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262011>
 8. Sogawa M, Seura T, Kohno S, Hirasaka K, Yamaguchi Y, Takagaki R, Harada A, Okumura Y, Yamamoto S, Kishi K, Nikawa T. Awa (Tokushima) lactate-fermented tea as well as green tea enhance the effect of diet restriction on obesity in rats. *J Med Invest*. 査読有、2009; 56(1-2):42-48
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262013>
 9. Oarada M, Kamei K, Gono T, Tsuzuki T, Toyotome T, Hirasaka K, Nikawa T, Sato A, Kurita N. Beneficial effects of a low-protein diet on host resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. *Nutrition*. 査読有、2009; 25(9):954-963
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403266>
 10. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol*. 査読有、2009; 29(17):4798-4811
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546233>
 11. Oarada M, Igarashi M, Tsuzuki T, Kurita N, Gono T, Nikawa T, Hirasaka K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kamei K. Effect of dietary oils on host resistance to fungal infection in psychologically stressed mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読有、2009; 73(9):1994-1998
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734677>
- [学会発表] (計9件)
1. 二川 健、寝たきりによる筋萎縮の分子メカニズムとその予防に対する栄養学的アプローチ、第9回高付加価値食品開発のためのフォーラム、2011.9.2、富士教育研修所(静岡県裾野市)
 2. 二川健、筋蛋白質代謝改善のための栄養学的アプローチ、第9回周術期体液・代謝・侵襲研究会、2011.8.6、御殿山ガーデン ラフォーレ東京(東京)
 3. Takeshi Nikawa, Nakao Reiko, Katsuya Hirasaka, Akira Higashibata, Inho Choi, Makoto Asashima, Edward M.Mills, Yuushi Okumura、Molecular mechanism of unloading-induced muscle atrophy and development of its countermeasures、2nd Annual Meeting of the Korean Microgravity Society、2011.5.13、延世大学原州キャンパス(韓国・原州市)
 4. 安倍知紀、市川雅子、平坂勝也、河野尚平、山下結衣、真板綾子、原田晃子、奥村裕司、青山敏明、二川健、骨格筋の脂肪酸代謝への中鎖脂肪酸の作用、第43回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、2010.10.6、高知女子大学(高知市)
 5. 二川健、無重力や寝たきりによる筋萎縮の分子メカニズム、第43回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、2010.10.6、高知女子大学(高知市)
 6. 二川健、寝たきりによる筋萎縮に対する予防食材として大豆ペプチドの有効性、大豆のはたらき in 徳島、2010.10.01、ホテルクレメント徳島(徳島市)
 7. Takeshi Nikawa、Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for IGF-1 signaling during muscle atrophy caused by unloading、ユビキチンカンファレンス、2010.8.23、米国、フィラデルフィア市
 8. 安倍知紀、平坂勝也、加川祥子、中尾玲子、河野尚平、矢野桃子、奥村裕司、青山敏明、二川健、骨格筋における中鎖脂肪酸の新規機能の探索、第42回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、2009.11.7、鳥取大学(鳥取)
 9. 二川健、廃用性筋萎縮に有効な抗ユビキチン化ペプチドの開発、第63回日本栄

養・食糧学会大会、2009.5.20、長崎ブリックホール（長崎市）

〔図書〕（計 2 件）

1. 二川健、メディカ出版、患者さんと二人三脚で行こう！ニュートリション・コーチング 第 1 回 コーチングとは何か、Nutrition Care Vol.4, No.1, 83-85, 2011
2. 二川健、メディカ出版、患者さんと二人三脚で行こう！ニュートリション・コーチング 第 2 回 管理栄養士はどうあるべきか、Nutrition Care Vol.4, No.2, 93-95, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://150.59.76.31/university/servlet/index/index?&level=4&reference=0/10002/5/30010/20032>

<http://kibo.jaxa.jp/experiment/theme/first/myolab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

二川 健 (NIKAWA TAKESHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20263824

(H21～H23)

平坂 勝也 (HIRASAKA KATSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70432747

(H21)

(2)研究分担者

奥村 裕司 (OKUMURA YUUSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70294725