

## 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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591013

研究課題名（和文）高脂肪食耐性ラットのエネルギー代謝特性と制御に関わる新たな分子基盤の解明

研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanism for energy metabolism of diet resistant rats

研究代表者

伊達 紫（DATE YUKARI）

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：70381100

研究成果の概要（和文）：高脂肪食摂取ラットから、抗肥満を呈する個体を検出し、それらのエネルギー代謝特性と脂肪組織での遺伝子発現を解析した。高脂肪食抵抗性ラットのエネルギー摂取や消費は高脂肪食肥満ラットと有意差はないものの、体重は有意に低下していた。同ラットの腸間膜脂肪組織のマクロファージでは、グアニリンとその受容体であるグアニル酸シクラーゼ C(GC-C)が高発現しており、グアニリン/GC-C ダブルトランスジェニック(Tg)ラットは高脂肪食に抵抗性を示した。これらの結果から、マクロファージでのグアニリン/GC-C システムは、脂肪蓄積制御に機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the characteristics of energy metabolism of diet resistant (DR) rats. There were no significant differences in energy intake and energy expenditure between DR and diet-induced obese (DIO) rats, whereas the body weights of DR rats were significantly lower than those of DIO rats. We analyzed gene expressions of mesenteric fat of DR rats and found high expressions of guanylin and its receptor; guanylyl cyclase C (GC-C) in the macrophages of mesenteric fat of DR rats. Therefore, we developed guanylin/GC-C double transgenic (Tg) rats and showed that Tg rats also have diet-resistance. Our data indicate that guanylin/GC-C system in the macrophage may contribute to the regulation of lipid accumulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：マクロファージ・メタボリック症候群・肥満・脂肪細胞

### 1. 研究開始当初の背景

生体の食物に対する反応にはバリエーションがあり、たとえば、高脂肪食を摂取し続けても肥満にならないヒトや動物、また、逆に肥満がないにもかかわらず糖尿病や動脈硬化の進行した患者をみることもある。このような反応性の違いに焦点を当てることで、

新たな肥満制御機構の解明や治療標的分子の同定につながる可能性がある。本研究では、高脂肪食に抵抗性を示すラットを用いて、生体の持つ肥満回避システムの解明を目指す。

### 2. 研究の目的

高脂肪食の持続摂取は、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。通常、ラットに高脂肪食を与えた場合、摂取2-4週後から明らかな体重増加を示す。今回、私たちは、高脂肪食摂取ラットの10-20%に普通食摂取ラットの平均体重を下回り、脂肪蓄積のきわめて少ない高脂肪食耐性ラットが存在することを見出した。本研究は、この高脂肪食耐性ラットのエネルギー代謝特性を生理学および生化学的に解析するとともに、遺伝子発現の網羅的解析から生体に備わった肥満発症を食止める新規肥満制御システムを解明し、肥満症の予防や治療標的分子の同定につなげていくことを目的とする。

### 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

4週齢の雄性 SD ラットを高脂肪食群(蛋白質20%、糖質20%、脂質60% [kcal%])と普通食群(蛋白質20%、糖質70%、脂質10% [kcal%])とに分けて飼育する。摂餌量、摂餌リズム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1週間毎に、血糖、血清脂質、代謝関連ホルモンの基礎値を測定する。高脂肪食投与8週間後で耐糖能およびインスリン感受性を評価する。さらに、DIO、DR、普通食ラットのエネルギー消費量を測定する。小動物用 CT 装置にて、各群ラットの内臓脂肪量を測定する。

#### (3) DIO、DR およびコントロールラットの発現遺伝子解析

高脂肪食投与10週間後で、各群ラットの腸間膜周囲脂肪を採取し、RNAを抽出する。RNAからcRNAを作製し、DRラットの腸間膜脂肪組織における特異的発現遺伝子をDNAマイクロアレイにて網羅的に解析する。

#### (4) DRの腸間膜脂肪特異的発現物質の産生細胞の同定

DRラット腸間膜脂肪組織で特異的に発現変動する遺伝子の発現細胞を免疫組織化学を用いて同定する。DR、DIO、コントロールラットの腸間膜脂肪組織を脂肪細胞分画と血管内皮、マクロファージ、白血球からなる細胞集団;stromal-vascular cell fraction (SVF)とに分け、RT-PCRを用いてDR特異的変動遺伝子の発現分画を確認する

#### (5) DR 特異的発現増加遺伝子の *in vitro* での機能解析

4) DR特異的に増加している遺伝子を発現する細胞株をスクリーニングする。細胞株での発現が確認された場合、初代培養脂肪組織

(市販)との共培養系を確立し、脂肪細胞の大きさや分化・増殖について検討する。DR特異的発現増加遺伝子をsiRNAでノックダウンした細胞と脂肪組織との共培養の結果、脂肪細胞の大きさや分化・増殖について評価し、DR特異的発現増加遺伝子の機能的裏づけを行う。

#### (6) DR 特異的発現変動遺伝子の遺伝子改変動物の作製と機能解析

4) で同定した発現細胞で従来特異的に発現している遺伝子の遺伝子座をコードするゲノムクローンを用いて、そのコード配列にDR特異的発現遺伝子を挿入した組み換えBACクローンを構築する。この組み換えゲノムクローンを精製し、ラットの受精卵に導入することで、目的とする遺伝子を組織特異的に発現させるセミノックインラットを作製する。作製した遺伝子改変動物が、高脂肪食に耐性を示すかどうかを検討する。同ラットの全身臓器の形態的観察、エネルギー代謝機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

高脂肪食を給餌しても肥満を呈さないDRラットを獲得し、エネルギー代謝特性や発現遺伝子について検討した。DRラットのエネルギー摂取量はDIOラットと差はなく、エネルギー消費量にも差はなかったが、体重はDIOラットを有意に下回っていた。DRラットの内臓脂肪蓄積は、普通食摂取ラットとほぼ同じでDIOラットに比べ有意に減少していた。血清脂質については、DIO、DR、普通食ラットの3群間で有意な差はなかったが、DRラットのインスリン値は正常でインスリン感受性が他の2群に比べきわめて良好であった。代謝関連因子の検討では、腸間膜脂肪組織におけるミトコンドリアβ酸化関連酵素の発現がDRラットで有意に増加していた。DRラットの腸間膜脂肪組織における遺伝子発現の検討から、生理活性ペプチド;グアニリンとその受容体であるグアニル酸シクラーゼC(GC-C)がマクロファージで高発現していることが明らかになった。両分子を発現しているマクロファージ細胞株と脂肪細胞の共培養では、脂肪滴の蓄積が有意に抑制されることが明らかになり、両分子の発現をsiRNAでノックダウンすると、脂肪滴蓄積抑制が解除されることも確認できた。

DRラットの出現率は5%以下であり、かつ、全てのDRラットがグアニリンとGC-Cを高発現しているわけではない。今回は、マイクロアレイで解析した7匹のDRのうち、3匹でグアニリンとGC-Cの高発現を認めた。マクロファージで発現するグアニリンとGC-Cが脂肪蓄積にどのように関与するかをより詳細に検討するために、グアニリン/GC-C過剰発現(Tg)ラットを作製した。マクロファージ特

異的に発現させるために、スカベンジャー受容体 A をプロモーターとして使用した。この Tg ラットを普通食で飼育しても、野生型 (WT) ラットとの間で摂餌量や体重に差を認めなかったが、高脂肪食で飼育すると摂餌量に差を認めないものの、Tg ラットの体重は WT ラットの体重を下回っていた。また、Tg ラットでは、行動量や酸素消費量が WT ラットに比べ増加していた。Tg ラットの脂肪細胞サイズは高脂肪食を摂取しても大きくなり、血中遊離脂肪酸やグリセロール、コレステロール値は Tg ラットと WT ラットとの間に有意な差はなかった。Tg ラットの腸間膜脂肪組織の脂肪細胞分化や成熟マーカーの発現は WT ラットと有意な差はなかったが、脂肪蓄積のための脂肪酸合成酵素や perilipin タンパクの発現は Tg ラットで有意に低下していた。さらに、脂肪酸β酸化関連酵素の発現は、高脂肪食を摂取した Tg ラットにおいて有意に増加していた。興味深いことに、高脂肪食を摂取した WT ラットの肝臓は顕著な脂肪肝を呈していたが、Tg ラットの肝臓はほぼ正常の形態を呈していた。高脂肪食を摂取した WT ラットで認められた高インスリン血症も Tg ラットでは認められなかった。

今回の研究で、マクロファージでのグアニリン/GC-C システムが、脂肪滴蓄積を抑制し肥満制御に機能していることが初めて明らかになった。グアニリン/GC-C のマクロファージでの発現調節機構やグアニリン/GC-C 発現マクロファージの産生する新規調節因子の同定は、肥満の予防や治療薬の開発につながる可能性が示唆された。

## 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 10 件)

- ① Akieda-Asai S, Sugiyama M, Miyazawa T, Koda S, Okano I, Senba K, Poleni PE, Hizukuri Y, Okamoto A, Yamahara K, Mutoh E, Aoyama F, Sawaguchi A, Furuya M, Miyazato M, Kangawa K, Date Y: Involvement of guanylin and GC-C in rat mesenteric macrophages in resistance to high-fat diet. *Journal of Lipid Research* (査読有) 54:85-96 (2013)
- ② Akieda-Asai S, Koda S, Sugiyama M, Furuya M, Miyazato M, Date Y: Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet. *Obesity Research & Clinical Practice* (査読有) in press (2013)
- ③ Date Y: Ghrelin and the Vagus Nerve. *Methods in Enzymology* (査読有) 514:261-269 (2012)
- ④ Poleni PE, Akieda-Asai S, Koda S,

Sakurai M, Bae C, Senba K, Cha Y, Furuya M, Date Y: Possible involvement of melanocortin-4-receptor and AMP-activated protein kinase in the interaction of glucagon-like peptide-1 and leptin on feeding in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (査読有) 420:36-41 (2012)

- ⑤ Date Y, Kangawa K: Ghrelin as a starvation signal. *Obesity Research & Clinical Practice* (査読有) 6:e263-269 (2012)
- ⑥ 伊達 紫: 摂食調節に作用する神経ペプチド—ニューロペプチド W の作用機構を中心として—, 肥満研究, 査読無 17:5-9 (2012)
- ⑦ 伊達 紫: CCK、PYY による摂食調節機構, 内分泌・糖尿病・代謝内科 (査読無) 34:39-43 (2012)
- ⑧ 伊達 紫: グレリン、GLP-1 による摂食制御, *GI Research* (査読無) 21:12-17 (2012)
- ⑨ 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 Practice* (査読有) 5:e119-e128 (2011)
- ⑩ 伊達 紫: グレリン、ガラニン、ネスファチンによる食欲・摂食調節, 日本臨床 (査読無) 増刊 127-132 (2011)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Date Y, Akieda-Asai S, Miyazato M, Kangawa K: Over expressions of guanylin and GC-C in rat mesenteric macrophages are involved in resistance to high-fat diet. *Keystone Symposia 2013. 1.28* アメリカ
- ② 秋枝さやか, 宮澤崇, 宮里幹也, 寒川賢治, 伊達 紫: 高脂肪食耐性 (Diet-Resistant) ラット特異的発現遺伝子による脂肪滴蓄積制御, 第 33 回日本肥満学会 2012. 10. 12 京都府
- ③ 伊達 紫, 秋枝さやか, 長谷川和哉, 宮澤崇, 宮里幹也, 寒川賢治: グアニリン/グアニル酸シクラーゼ C ダブルトランスジェニックラットは肥満抵抗性を示す, 第 33 回日本肥満学会 2012. 10. 12 京都府
- ④ ベ チョロン, 仙波和代, 秋枝さやか, 伊達 紫: ソフトペレット (軟食) で飼育したラットは肥満と耐糖能異常を呈する, 第 33 回日本肥満学会 2012. 10. 12 京都府
- ⑤ 秋枝さやか, ベ チョロン, 長谷川和哉, 伊達 紫: グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) とレプチンの同時投与による摂食抑制効果に関する分子機構, 第 39 回日本

神経内分泌学会 2012.9.28 福岡県

- ⑥秋枝さやか, Poleni PE, 櫻井麻矢, 幸田修一, 古谷真優美, 伊達 紫: グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) とレプチンの摂食抑制相乗効果に関する分子機構の解明, 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012.4.21 愛知県
- ⑦Poleni PE, Akiieda-Asai S, Senba K, Date Y: Synergistic action of glucagon-like peptide-1 with leptin on anorectic effect. 第 32 回日本肥満学会 2011.9.23 兵庫県
- ⑧Akiieda-Asai S, Sugiyama M, Miyazawa T, Koda S, Okano I, Senba K, Poleni PE, Hizukuri Y, Okamoto A, Mutoh E, Furuya M, Miyazato M, Kangawa K, Date Y: A new bioactive peptide and its receptor cascades prevent the accumulation of lipid droplets. Keystone Symposia (Lipid Biology and Lipotoxicity) 2011.5.18 アメリカ
- ⑨伊達 紫: Ghrelin. 第 31 回日本肥満学会, 2010.10.1 群馬県
- ⑩Date Y, Shimomura Y, Mori M, Shioda S, Cone RD, Nakazato M: A role for NPW, an anorectic neuropeptide, in feeding and energy metabolism, 11<sup>th</sup> International Congress on Obesity, 2010.7.10 スウェーデン

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊達 紫 (Date Yukari)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授  
研究者番号 : 70381100

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

宮里 幹也 (Miyazato Mikiya)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部部長  
研究者番号 : 50291183