

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700835

研究課題名（和文）リポ蛋白リパーゼトランスジェニックウサギを用いたエネルギー代謝研究
 研究課題名（英文）Investigation on energy metabolism using transgenic rabbits overexpressing lipoprotein lipase

研究代表者

西田 裕一郎 (YUICHIRO NISHIDA)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50530185

研究成果の概要（和文）：本研究では、肥満になりにくい特徴があるリポ蛋白リパーゼ（LPL）トランスジェニック（Tg）ウサギを用いて、エネルギー摂取量や消費量、耐糖能・インスリン作用、血中脂質プロファイル、血中エネルギー代謝関連因子を測定し、肥満に対する抵抗性が生じるメカニズムやエネルギー消費と糖・脂質代謝能の関連について検討した。LPL-Tg群の体重はコントロールと比較して低かったが摂食量はむしろ多かった。二重標識水を用いたエネルギー消費量測定の前段階的解析から、LPL遺伝子の活性化がエネルギー消費の亢進を引き起こす可能性が示唆された。また相関分析により、LPL遺伝子活性化によるエネルギー消費の亢進が耐糖能の改善と中性脂肪の低下に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The current study examined energy intake and expenditure, glucose tolerance/insulin action, blood lipid profile, and circulating factors involved in energy metabolism in lipoprotein lipase transgenic (LPL-Tg) and non-Tg (control) rabbits, and investigated mechanisms on the obesity resistance in LPL-Tg rabbits and associations between energy expenditure and glucose/lipid metabolism. Weight was lower in LPL-Tg rabbits despite their higher food intake. The current preliminary analysis on the energy expenditure using doubly labeled water suggested that activation of LPL gene induced an enhancement of energy expenditure. Additionally, the current correlation analysis suggested that increase in energy expenditure induced by LPL activation may be linked with better glucose tolerance and lower triglyceride level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：肥満

1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白リパーゼ（LPL）は体中の多くの組織（骨格筋、脂肪、膵臓、免疫細胞など）より

で産生され、血中脂質（リポ蛋白、 kilomikron、 Very low-density lipoprotein [VLDL]) を加水分解する機能をもつ酵素である。LPL

が機能しないと血中に脂質が停滞し脂質異常が生じ、動脈硬化、インスリン抵抗性が引き起こされることが分かっている。

先行研究により、ヒトLPLを全身の組織で発現するLPL トランスジェニック (Tg) ウサギはコントロールと比較して、血中の中性脂肪と総コレステロールのレベルが低値を示し、体脂肪率が低いことが報告されている。しかし、肥満研究において基本的なエネルギー摂取量と消費量の測定や、血中や筋・脂肪組織のエネルギー代謝に関与するさまざまなファクターについての解析はこれまでに行われておらず、LPL-Tgウサギの肥満抵抗性に関するメカニズムは未知である。

実験動物を用いた研究では、エネルギー摂取量については、与えた餌の重量減少から簡易に正確な測定が出来る。一方、エネルギー消費量を精度よく測定することは容易ではない。二重標識水法 (DLW, Doubly Labeled Water) はLifson らによって1955年に開発された手法であるが、今日までエネルギー消費量測定のゴールドスタンダードとして用いられている。エネルギー代謝測定の難しい点は、測定環境がエネルギー消費に与える影響をどのように最小限にするかということである。例えば、呼気ガス測定によりエネルギー消費量を推定する方法では測定用のチャンバーに動物を入れたり、飼育ケージをビニルで覆うことで動物のエネルギー代謝に影響を与えてしまうおそれがある。一方、DLW法ではそのような測定の影響を受けることなく、非拘束下でのエネルギー消費量を最も正確に測定することが可能である。よって、本研究ではエネルギー消費量の測定にDLW法を用いた。

エネルギー消費量に影響を及ぼすファクター

の候補としては、血中ホルモン(インスリン、甲状腺ホルモン[T3, T4]、遊離脂肪酸)や血中炎症物質がある。また、骨格筋や脂肪細胞におけるエネルギー代謝に関連する遺伝子群(脂質代謝に関連する β 酸化、TCA サイクル、電子伝達系の遺伝子、脱共役タンパク質等)の発現もLPL-Tgウサギのエネルギー消費量のレベルを制御している候補である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LPL-Tgウサギを用いて、エネルギー消費量と摂取量、エネルギー代謝にかかわるホルモンなどの血中物質、耐糖能/インスリン作用、血中脂質プロファイル、骨格筋・脂肪組織の遺伝子の発現を測定し、肥満に対する抵抗性が生じるメカニズムや、エネルギー消費と糖・脂質代謝能の関連について検討することである。

3. 研究の方法

本研究では、1) 通常の食餌、2) 高脂肪食の2つの条件下で、エネルギー消費量、食餌摂取量、体重等の測定を行った。

LPL-Tgウサギは、ヒトリポ蛋白リパーゼをコードするcDNA やその他の調節遺伝子を組み込んだコンストラクトをウサギ受精卵へマイクロインジェクションし、仮親の卵管内へ胚移植することにより得られた。LPL-Tgウサギの凍結精子と約10匹の通常のメスを用いてLPL-Tgウサギを繁殖させた。全てのウサギは、全面開閉部ロック式の飼育ケージにて個別飼育した。

LPL-Tgウサギとコントロールウサギに規定食(通常食と高脂肪食)を与える期間は、Kitajima らの先行研究(Diabetologia, 2004)に準じて、それぞれ16週間(24週齢~40週齢)とした。通常食実験と高脂肪食実験

には1群あたり、LPL-Tgウサギ12羽とコントロールとして同腹のnon-Tgウサギ12羽を使用した。

規定食摂取前と規定食摂取期間最後の週で、DLWを用いたエネルギー消費量の測定を次のように行った。ベースラインの測定として、DLW投与の1日前に、血液を7mlずつ耳動脈より採取した。その翌日、体重1kg当たり0.8gのDLW (10%³H₂18O) を耳静脈より注入した。DLW静注の4時間後に、DLW濃度測定のために耳動脈より7ml採血した。同様の採血方法で、DLW投与7日後に採血を行った。採血後、血漿を分離し冷凍保存した。DLW分析装置を用いて、各測定時点で採取された血漿中のDLW濃度を同時に測定した。これらの血漿サンプルのDLW濃度の測定値から1週間あたりのエネルギー消費量が算出される（現在、既に測定された二重標識水の濃度を使用してエネルギー消費量・体脂肪率を解析中）。

高脂肪食摂取後の時点において耐糖能とインスリン作用を測定するために、LPL-Tgウサギとnon-Tgコントロールウサギに静注糖負荷テストを実施した。一晩絶食後、50%グルコースを体重1kgあたり1.2 ml耳静脈より注入し、以下のタイムポイントで採血した（5分、10分、15分、20分、30分、60分、120分）。採取された血液サンプルの血糖値とインスリン値を測定した。

規定食（通常食、高脂肪食）摂取前と摂取後（16週間後）に、12時間以上絶食した後、血中脂質（総・HDL・LDLコレステロール、中性脂肪）、エネルギー代謝関連ホルモン（インスリン、甲状腺ホルモン、遊離脂肪酸）と血中炎症マーカー（C-Reactive protein）を測定するための血液を採取した。また、エネルギー

代謝関連遺伝子の発現解析のために、骨格筋組織（腓腹筋、ヒラメ筋）や脂肪組織（内臓脂肪、皮下脂肪）を採取した。

データは、平均値で示した。2群の比較はT検定を用いて、相関分析はピアソンの相関係数を用いて行った。統計ソフトSAS9.3を使用した。統計的有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

通常食下において（24週齢）、LPL-Tgウサギの体重は、non-Tgと比較して有意に低値を示した（non-Tg: 3455, LPL-Tg: 3096, g）。一方、LPL-Tg群の体重あたりの摂食量は、non-Tg群と比較して有意に高かった（non-Tg: 39.7, LPL-Tg: 46.0, g/kg）。すなわちLPL-Tgウサギは摂食量が多いにも関わらず体重が低いことを意味する。正確なエネルギー消費量・体脂肪率は、現在、既に分析済みの血中DLW濃度データを使用して解析中である。予備的な解析の結果であるが、DLW投与7日後の血中DLW濃度がLPL-Tg群で低値を示しており（180: non-Tg 2036, LPL-Tg 2027, ppm; H₂: non-Tg 175, LPL-Tg 170, ppm）、これは通常食下におけるLPL-Tg群のエネルギー消費量の亢進を示唆する。

16週間の高脂肪食摂取後（40週齢）においても、LPL-Tg群の体重は、non-Tg群と比較して有意に低値を示した（non-Tg: 3849, LPL-Tg: 3346, g）。また、通常食から高脂肪食に変更したことによる体重の増加も、LPL-Tgウサギの方が少なかった（non-Tg: 393, LPL-Tg: 250, g）。エネルギー消費量について予備解析を行った結果、通常食下と同様、LPL-Tg群でDLW投与7日後の血中DLW濃度が有意に低く（180: non-Tg 2053, LPL-Tg 2045, ppm; H₂: non-Tg 182, LPL-Tg 178, ppm）、高脂肪食下においてもLPL-Tgウサギのエネ

ルギー消費量が亢進している可能性がある。

高脂肪食摂取後において血中脂質を測定した結果、総・LDL・HDL コレステロールについては両群間で差が認められなかったが、中性脂肪は LPL-Tg 群の方で低値を示した (non-Tg 33.8, LPL-Tg 2.6, mg/dL)。空腹時血糖値についても同様であり、LPL-Tg ウサギで低値であった (non-Tg 159, LPL-Tg 139, mg/dL)。インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) とインスリン感受性指標 (Matsuda Index[この指標は通常、ヒトの経口糖負荷テスト中の血糖とインスリンを用いて算出されるが本研究では静脈糖負荷テストのデータを使用して計算]) も、両群間に統計的に有意な差が認められ、LPL-Tg ウサギが好ましい値を示した。

甲状腺ホルモン (T3, T4) はエネルギー代謝を亢進させる作用をもつホルモンであるが、予想外に、LPL-Tg ウサギの T3 のレベルは non-Tg と比較して有意に低かった (non-Tg: 58.5, LPL-Tg: 42.5, ng/dL)。一方、T4 (non-Tg: 2.9, LPL-Tg: 3.2, µg/dL) と C-Reactive protein (non-Tg: 3.7, LPL-Tg: 4.1, µg/mL)、遊離脂肪酸 (non-Tg: 0.51, LPL-Tg: 0.38, mEq/L) の血中レベルは、いずれも両群間で統計的に有意な差は認められなかった。

全例 (n=24) を対象として相関分析を行った結果、DLW 投与 7 日後の血中 DLW 濃度 (180) と、中性脂肪 (r=0.43)、空腹時血糖値 (r=0.55)、静注糖負荷テスト中の血糖曲線下面積 (r=0.44) との間に有意な正の相関関係が認められた。

本研究により、LPL 遺伝子の発現増強がエネルギー消費量の増加につながる可能性が示

唆された。甲状腺ホルモン (T3) のレベルは LPL-Tg でむしろ低値を示したことから、LPL-Tg のエネルギー消費の亢進は甲状腺ホルモンに依存しないと考えられる。さらに、LPL 遺伝子の活性化によるエネルギー消費量の亢進が耐糖能の改善と中性脂肪の低値とリンクしている可能性が示唆された。今後は、既に保存されている筋・脂肪組織を用いて代謝関連遺伝子の発現解析を加えて、エネルギー消費量を左右する要因とエネルギー消費が糖・脂質代謝に与える影響についてさらに検討を深めたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kazutoshi Nishijima, Yosuke Yamada, Hiroaki Tanaka, Shuji Kitajima, Shinji Yamaguchi, Masatoshi Morimoto, Keitaro Tanaka, and Yuichiro Nishida. Assessment of energy expenditure in rabbit with doubly-labeled water method. 4th International Rabbit Biotechnology Meeting, Budapest, Hungary, 30th June—1st July 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 裕一郎 (YUICHIRO NISHIDA)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号: 50530185

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: