

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：17201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25350889
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抗肥満・抗糖尿病のメタボロミクス

研究課題名(英文) Metabolomics of anti-obesity and anti-diabetes using lipoprotein lipase transgenic rabbits

研究代表者
西田 裕一郎(Nishida, Yuichiro)
佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50530185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：リポ蛋白リパーゼトランスジェニックウサギ(LPL-Tg)は、肥満・糖尿病になりにくい特徴をもつ。LPL-Tg群とコントロール群の骨格筋の代謝物質を網羅的に測定した結果、40種類の濃度の異なる代謝物質が見つかった。これらは、TCAサイクル、尿素サイクル、アミノ酸代謝、カルニチン代謝等に関与するものであった。特に、N-Acetylneuraminic acid濃度の増加はエネルギー消費の亢進と関連し、一方、シスタチオンの増加はエネルギー消費の抑制と関連した。加えて、メチオニンの増加はインスリン抵抗性の改善と関連した。これらの代謝物質の増加または低下が抗肥満・抗糖尿病の重要なメカニズムと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Lipoprotein lipase transgenic (LPL-Tg) rabbits have been reported to be protected against obesity and diabetes. Skeletal muscle is a major organ responsible for energy and glucose metabolism. We analyzed muscle metabolites profile, and simultaneously measured whole body energy expenditure (EE) and insulin resistance (IR) in LPL-Tg and control rabbits under high-fat-diet condition. Among 165 muscle metabolites measured, concentration levels of 40 metabolites were significantly different between the two groups. These muscle metabolites were involved in, for instance, TCA cycle, urea cycle, amino acid and carnitine metabolism. Particularly, N-acetylneuraminic acid was positively correlated with the whole body EE, while cystathionine was inversely related to the EE. Additionally, higher methionine concentration was associated with lower IR. Thus, the upregulation or downregulation of identified muscle metabolites may be important mechanisms underlying the anti-obesity/diabetes of LPL-Tg.

研究分野：運動生理学

キーワード：骨格筋代謝 メタボロミクス 肥満 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) リポ蛋白リパーゼ (LPL) は骨格筋や脂肪組織に存在し、血液中のリポ蛋白 (キロミクロン、Low-Density Lipoprotein [LDL] など) の構成成分である中性脂肪を加水分解する役割を担う酵素である。LPL による中性脂肪分解で脂肪酸が生じ、その脂肪酸は骨格筋や脂肪細胞などに取り込まれ、エネルギー (ATP) 産生の基質として使用されたり、または、再びそれらの組織の中で中性脂肪に合成される。仮に、LPL が機能しないとキロミクロンや LDL などのリポ蛋白が血液中に停滞し脂質異常が生じる。一方、ヒト LPL 遺伝子を全身の細胞で高発現する LPL トランスジェニックウサギ (以下、LPL-Tg ウサギ) では、血中の中性脂肪の濃度が非常に低い。加えて、興味深いことに、高脂肪食誘発性の肥満に対して強い抵抗性を示す。すなわち、LPL-Tg ウサギは肥満になりにくい特徴をもつ。先行研究によると、皮下脂肪重量についてはコントロールと殆ど変わらないが、内臓脂肪量が著しく減少していると報告されている。同時に、この LPL-Tg ウサギにはインスリン抵抗性も認められない。

(2) LPL が血液中に存在するリポ蛋白の中の中性脂肪を分解する機能をもつことから、LPL 遺伝子の高発現が血中脂質の低下を引き起こすことは容易に想像できるが、一方、なぜ、LPL 遺伝子の高発現により肥満・糖尿病になりにくくなるのかについては未だよく分かっていない。筆者は、LPL-Tg ウサギがもつ抗肥満・抗糖尿病という望ましい代謝的な特徴に、骨格筋が中心的な役割を果たしているのではないかと考えている。骨格筋の LPL の遺伝子発現レベルが、長距離ランナーで高いということが知られている。また、持続的なトレーニングにより (低強度の有酸素トレーニングでも) 骨格筋の LPL 活性が増加するという報告がある。筆者の知る限り、骨格筋 LPL とエネルギー消費量の直接的な関連についての報告はないが、持久力が高い者ほど体熱産生 (食事の後の体温上昇やエネルギー消費) が亢進しているという報告はある。LPL-Tg ウサギでは全身で LPL 遺伝子の発現が亢進しているが、特に、骨格筋において LPL 遺伝子の発現に顕著な増加がみられる。この動物モデルの LPL 活性は脂肪細胞ではコントロールと比較して殆ど変わらないが、骨格筋においてはその活性は 4 倍である。さらに、筆者は以前、ランナーと運動習慣がないコントロールを対象として静脈糖負荷テストを実施し、ランナーでインスリン作用とインスリン非依存性の糖取り込み能の両者が高いという知見を得たが (Nishida et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002)、糖負荷

テスト中のグルコース、インスリン、遊離脂肪酸の濃度変化もまた、ランナーと LPL-Tg ウサギとで非常によく似ていた。これらの理由から、筆者は、LPL-Tg ウサギは運動トレーニングにより誘発された望ましい糖・脂質代謝をもつヒト (すなわち、ランナー) と類似した代謝的特徴をもつ貴重な抗肥満・抗糖尿病の動物モデルであると考えている。

(3) 近年、質量分析法の急速な進歩により、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計) などの質量分析機器を用いて生体内の DNA, RNA, タンパク質以外のあらゆる代謝物質 (すなわち、メタボロームまたは代謝物プロファイル) を測定することが可能になった。この研究分野または手法が、メタボロミクスと呼ばれる。メタボロミクスを用いると、例えば、遺伝子改変疾患動物モデル (または患者) の試料と野生型動物 (または健康者) の試料 (血液、骨格筋など) の代謝物質プロファイル (数百から数千種類と想定される) の同時測定を行うことが出来、疾患に關与する代謝物質と代謝経路を見つけ出すことが可能である。例えば、肥満モデル動物では、乳酸濃度が血液・尿・肝臓において共通して上昇していることが見出されている。このことは、肥満のメカニズムの一つとして、エネルギー (ATP) 産生を解糖系に依存していることを示している。

(4) 肥満やその他の生活習慣病のメタボロミクス研究がそれらの疾患のメカニズム解明やバイオマーカー探索に貢献しているが、未だ緒に就いたばかりである。これまでに、抗肥満・抗糖尿病に関する代謝物質の同定を目的としたメタボロミクス研究はみあたらない。最近のメタボロミクスの国際情勢として、医薬研究とは異なる“健康”への注目度が大きくなってきたという向きがある (第 8 回国際メタボローム会議、ワシントン DC, 2012.7.25-28)。これらのことから筆者は、運動習慣をもつヒト (すなわち、ランナー) とよく似た望ましい糖・エネルギー代謝的特徴をもつ LPL-Tg ウサギを抗肥満・抗糖尿病の動物モデルとして用いて、糖・エネルギー代謝に重要な役割を果たしている器官である骨格筋のメタボロームを測定し、LPL-Tg ウサギとコントロールの比較や肥満・糖尿病に關係するフェノタイプとの関連を解析することで、抗肥満・抗糖尿病に關わる代謝物質または代謝経路を見出したいと考えるに至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、LPL-Tg ウサギの骨格筋の代謝物質濃度を網羅的に測定し、抗肥

満・抗糖尿病に関わる可能性がある代謝物質・代謝経路を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) 26週齢のLPL-Tgウサギ(n=12)とコントロールウサギ(n=12)を研究対象として用いた。これらのウサギに16週間、高脂肪食(通常食にラード・コーン油を加えて作成[脂質 34%、炭水化物 49%、タンパク質 17%])を与えた後、二重標識水法による総エネルギー消費量の測定、静注糖負荷テストによるインスリン抵抗性の評価、血液生化学測定、メタボローム解析のための骨格筋採取を行った。

(2) 二重標識水法($^2\text{H}_2\text{O}$ and H_2^{18}O [安定同位体])は、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出来る手法である。二重標識水(大陽日酸株式会社により購入)投与前のベースラインの測定として、二重標識水の投与の1日前に、血液(7 mL)を耳動脈より採取した。その翌日、二重標識水を体重1 kg 当たり0.92 g、耳静脈より注入した。二重標識水投与の4時間後に、二重標識水の血中濃度の測定のために耳静脈より7 mL ずつ採血した。同様の採血方法で、二重標識水投与7日後に採血した。採取した血液サンプルの二重標識水の濃度を測定し(大陽日酸株式会社に依頼)プラトー法を用いて総エネルギー消費量を算出した。加えて、エネルギー消費量の測定期間中は、体重と食餌(高脂肪食)摂取量の測定も行った。

(3) インスリン抵抗性を評価するための静注糖負荷テストに関しては、16時間以上の絶食後(水のみ自由摂取)、糖負荷前の血糖・インスリン濃度の測定のために空腹時の血液サンプルを採取した。その後、50%グルコース溶液を体重1 kg 当たり1.2 mL、耳静脈より投与した(2分間で投与終了)。静注糖負荷テスト中の血糖値とインスリン濃度の測定のため、グルコース溶液投与の5分後、10分後、15分後、20分後、30分後、60分後、120分後の7時点で、耳動脈より採血した。静注糖負荷テスト中の血糖曲線下面積とインスリン曲線下面積の積をインスリン抵抗性の指標とした。

(4) 最後に、16時間以上の絶食後に、エネルギー代謝関連の血液生化学分析のための採血とメタボローム解析のための骨格筋採取を行った。血液生化学分析の測定項目は、総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール、LDL コレステロール、甲状腺ホルモン(T3とT4)、C反応性蛋白、乳酸とした。骨格筋サンプルは、麻酔薬投与下で、腓腹筋(赤筋部分)を採取した。採取された骨格筋試料は直ちに液体窒素につけられ、メタボローム解析に使用されるまで-80 超低温槽に保管

された。全てのウサギ(n=24)の中で、18羽(LPL-Tgウサギn=9、コントロールウサギn=9)の骨格筋試料をメタボローム解析に使用した。骨格筋サンプルのメタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社(カチオン用20 μM 及びアニオン用5 μM 内部標準物質)を加え、冷却下にてピーズ式細胞破碎装置を用いて破碎した。骨格筋組織を破碎した後、遠心分離を行った。遠心分離後、上層を限外ろ過チューブに移し、これを遠心し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び50 μL の超純水に溶解してメタボローム解析に使用した。メタボローム解析は、Agilent CE-TOFMS(キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計) system(Agilent Technologies社)を用いて、カチオンモードとアニオンモードで測定した。得られたピーク強度と形状から判断して、カチオンモードでの測定には5倍、アニオンモードでの測定には10倍に希釈した骨格筋試料を用いた。CE-TOFMSで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアMasterHands ver.2.13.0.8.h(慶應義塾大学により開発)を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比(m/z)、泳動時間(Migration time: MT)とピーク面積値を算出した。算出されたピーク面積値は、相対面積値に変換された。この結果、165(カチオン98、アニオン67)のピークが検出された。

(5) 統計解析について、LPL-Tgウサギ群とコントロール群の特性に関するデータ(体重や生化学検査等)の2群間の比較は、対応のないt検定を用いて行った。骨格筋代謝物質の2群間の比較には、Welchのt検定を用いた。骨格筋代謝物質(独立変数)とエネルギー消費量(目的変数)、インスリン抵抗性(目的変数)の関連については、スピアマンの順位相関係数を用いた。全ての統計解析は、統計ソフトSASソフトウェアプログラム(バージョン9.3)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食を16週間摂取した後、LPL-Tg群の体重は、コントロール群と比較して有意に低値を示した(コントロール: 平均値3455 \pm 標準偏差139, LPL-Tg: 3096 \pm 206 g, $p < 0.05$)。高脂肪食の摂食量に関しては、LPL-Tg群とコントロール群で同様であり有意な差はみられなかったが、二重標識水法で評価したエネルギー消費量は、LPL-Tg群で有意に高値を示した(コントロール: 88.1 \pm 7.1, LPL-Tg: 94.0 \pm 6.5 kcal/kg weight/day, $p < 0.05$)。血糖値、インスリン値、中性脂肪は、いずれもLPL-Tg群の方がコントロール群よりも低い値を示した($p < 0.05$)。一方、予想とは逆に、エネルギー消費を増大させる作用がよく知られている甲状腺ホルモ

ン (T3) の濃度が LPL-Tg 群でむしろ有意に低かった (コントロール: 58.5 ± 13.2 、LPL-Tg: 42.5 ± 12.5 ng/dL, $p < 0.05$)。もう一つの甲状腺ホルモンである T4 の血中濃度は 2 群間で同様であった。中性脂肪以外の血中脂質、C 反応性蛋白、乳酸の血中濃度レベルには、2 群間で有意な差は認められなかった。静注糖負荷テストにより評価されたインスリン抵抗性指標は、予想どおり LPL-Tg 群の方が有意に低い値 (良い値) を示した (コントロール: 50905 ± 23159 、LPL-Tg: 21455 ± 6826 , $p < 0.01$)。

(2) 骨格筋のメタボロームに関しては、測定された 165 代謝物質の中で、LPL-Tg 群とコントロール群で統計的に有意に異なる代謝物質が 40 種類見つかった。抗肥満・抗糖尿病という特徴をもつ LPL-Tg 群の骨格筋では、TCA サイクルに関する代謝物質 (Citric acid [クエン酸], Malic acid [リンゴ酸] 等) の濃度が増加していた (日本語表記が一般的になっている代謝物質については角括弧内に日本語表記を併記)。同様に、ペントースサイクルに分類されたいくつかの代謝物質 (Ribulose 5 phosphate, Glycerol [グリセロール] 等) も増加していたが、NADH や NAD^+ は有意に低下していた。また、骨格筋中の尿素サイクルに関連する代謝物質 (Ornithine [オルニチン], Argininosuccinic acid, Arginine [アルギニン]) の濃度は、LPL-Tg 群で一貫して高かった。特に、LPL-Tg 群のオルニチン濃度の平均値は、コントロール群の平均値の 3 倍以上も高かった。クレアチニン・ボーフィリン関連では、LPL-Tg 群において Phosphocreatine (ホスホクレアチン) 濃度が高値を示し、一方、Guanidoacetic acid と呼ばれる代謝物質の濃度は低レベルであった。アミノ酸関連の代謝物質にも 2 群間の差が認められ、LPL-Tg 群で筋組織中の濃度が高かったのは、Histidine [ヒスチジン]、3-Methyl histidine [メチルヒスチジン]、Proline [プロリン]、Asparagine [アスパラギン]、Phenylalanine [フェニルアラニン]、Methionine [メチオニン]、Serine [セリン]、Isoleucine [イソロイシン]、Leucine [ロイシン] 等であった。一方、LPL-Tg 群において低い濃度を示したのは、Ethanolamine やカルニチン関連の代謝物質 (Carnitine [カルニチン]、Octanoylcarnitine、Butyrylcarnitine)、Cystathione [シスタチオン]、Sarcosine [サルコシン] 等であった。その他、ピリミジン・プリン代謝に関する代謝物質では、UDP-glucose と GDP-glucose が LPL-Tg 群において高値を示した。加えて、未分類の代謝物質の中にも LPL-Tg 群で有意な増加を示したものがあり、それらは、Gly-Asp、Gly-Gly などのジペプチドや SDMA、ADMA 等の骨格筋代謝物質であった。

(3) 二重標識水法で評価したエネルギー消

費量と最も関連が強かった骨格筋代謝物質は、N-Acetylneuraminic acid ($r = 0.67$, $p = 0.002$)、Cystathione [シスタチオン] ($r = -0.61$, $p = 0.008$)、3-Methylhistidine [メチルヒスチジン] ($r = 0.60$, $p = 0.008$) であった。一方、静注糖負荷テストにより評価したインスリン抵抗性と最も関連が強かった代謝物質は、Methionine [メチオニン] ($r = -0.66$, $p = 0.003$)、Citric acid [クエン酸] ($r = -0.64$, $p = 0.004$)、Asparagine [アスパラギン酸] ($r = -0.59$, $p = 0.010$) であった。

(4) 以上の結果をまとめると、抗肥満・抗糖尿病を呈する LPL-Tg ウサギの骨格筋において増加していたのは、TCA サイクル (Citric acid [クエン酸] 等)、ペントースサイクルの一部の代謝物質 (Ribulose 5 phosphate 等)、尿素サイクル (Ornithine [オルニチン] 等)、Phosphocreatine (ホスホクレアチン)、そしてヒスチジン代謝関連のアミノ酸 (Histidine [ヒスチジン]、3-Methylhistidine [メチルヒスチジン] 等) であった。加えて、その他いくつかのアミノ酸 (Proline [プロリン]、Asparagine [アスパラギン]、Phenylalanine [フェニルアラニン]、Methionine [メチオニン] 等) も増加を示した。一方、LPL-Tg ウサギにおいて低下していたのは、NADH や NAD^+ の濃度レベル、Ethanolamine、カルニチン関連の代謝物質 (Carnitine [カルニチン] 等)、Cystathione [シスタチオン]、Sarcosine [サルコシン] 等の代謝物質の濃度レベルであった。これらの骨格筋代謝物質・骨格筋における代謝経路のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションが、抗肥満・抗糖尿病の鍵となるメカニズムになっている可能性がある。特に、N-Acetylneuraminic acid と 3-Methylhistidine [メチルヒスチジン] の筋中濃度の増加はエネルギー消費量の亢進と関連し、一方、Cystathione [シスタチオン] の筋中濃度の増加はエネルギー消費の抑制と関連した。インスリン抵抗性に関しては、筋組織内の Methionine [メチオニン]、Citric acid [クエン酸]、Asparagine [アスパラギン] の濃度の増加は、いずれもインスリン抵抗性の改善と関連する。これらの代謝物質の増加または低下が LPL-Tg がもつ抗肥満・抗糖尿病の重要なメカニズムと考えられた。しかし、本研究は横断研究であり、因果関係までは分からないという限界がある。本研究で同定された骨格筋代謝物質とその代謝経路のアップレギュレートまたはダウンレギュレートが、実際に、細胞レベルまたは個体レベルで抗肥満・抗糖尿病を引き起こすことが出来るかどうか更なる検討が必要である。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

Yuichiro Nishida, Kazutoshi Nishijima, Fumika Mi-ichi, Yosuke Yamada, Hiroaki Tanaka, Jianglin Fan, Shuji Kitajima, Keitaro Tanaka. Muscle metabolites potentially involved in enhanced insulin action in lipoprotein lipase transgenic rabbits. 第4回ウサギバイオサイエンス研究会. 2016年8月6日. 佐賀大学(佐賀県・佐賀市)

西田裕一郎. 抗肥満・抗糖尿病に關与する骨格筋代謝物質の探索 リポ蛋白リパーゼトランスジェニックウサギを用いた検討. 第8回分子骨格筋代謝研究会. 2016年7月30日. 京都大学(京都府・京都市)

Yuichiro Nishida, Kazutoshi Nishijima, Fumika Mi-ichi, Yosuke Yamada, Hiroaki Tanaka, Jianglin Fan, Shuji Kitajima, Keitaro Tanaka. Skeletal muscle metabolites potentially involved in favorable energy metabolism in anti-obesity lipoprotein lipase transgenic rabbits. International Conference on Obesity & Chronic Diseases. July 25-27, 2016. Hampton Inn Tropicana and Event Center (Las Vegas, USA)

Yuichiro Nishida, Kazutoshi Nishijima, Fumika Mi-ichi, Yosuke Yamada, Hiroaki Tanaka, Jianglin Fan, Shuji Kitajima, Keitaro Tanaka. METABOLOMIC PROFILING REVEALS MUSCLE METABOLITES THAT ARE ASSOCIATED WITH FAVORABLE GLUCOSE, LIPID AND ENERGY METABOLISM IN LIPOPROTEIN LIPASE TRANSGENIC RABBITS. 5th ICCR Congress on Chronic Societal Cardiometabolic Diseases. July 8-12, 2015. Quebec City Convention Center (Quebec, Canada)

Yuichiro Nishida, Kazutoshi Nishijima, Fumika Mi-ichi, Jianglin Fan, Shuji Kitajima, Keitaro Tanaka. Metabolic features of skeletal muscle in lipoprotein lipase transgenic rabbits protected against high-fat-diet-induced obesity and diabetes. Metabolomics 2014. Jun 23-26, 2014. Marica/Washington Hotel (Tsuruoka, Yamagata)

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

出願状況(計 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 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

西田 裕一郎 (NISHIDA, Yuichiro)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：50530185

(2) 研究分担者

西島 和俊 (NISHIJIMA, Kazutoshi)
秋田大学・バイオサイエンス教育・研究センター・准教授
研究者番号：70435874

見市 文香 (MI-ICHI, Fumika)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：70576818

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()