

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850095

研究課題名(和文) 低タンパク質栄養によるアディポネクチン増加機構の解明とその生理的意義

研究課題名(英文) The mechanisms by which protein malnutrition increases circulating adiponectin levels in rats

研究代表者

鈴木 由香(豊島由香)(Toyoshima, Yuka)

日本医科大学・付置研究所・講師

研究者番号：70516070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一つであり、インスリン感受性を上昇させ、生活習慣病の発症を抑える働きがある。我々は、成長期のラットに低タンパク質食を給餌すると血中のアディポネクチンが増加することを見出した。これは、脂肪細胞での合成促進によって起こるのではなく、脂肪細胞からの分泌促進もしくは血中での分解抑制によって起こることがわかった。さらに、低タンパク質食給餌による血中アディポネクチンの増加は、血中のインスリンやインスリン様成長因子1の減少を脂肪細胞が直接感知して起こると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Adiponectin is a protein that is mainly secreted from adipocytes and exhibits an antidiabetic property, which enhances insulin action. Our previous studies showed that protein malnutrition caused increases in circulating adiponectin levels in growing rats. In this study, we found that the enhancement of adiponectin secretion from adipocytes and/or the suppression of its degradation in the blood result in the elevation of circulating adiponectin levels in protein-malnourished rats. Furthermore, it was suggested that lower circulating insulin and insulin-like growth factor-1 contribute to enhance adiponectin secretion from adipocytes under protein malnutrition.

研究分野：分子栄養学

キーワード：アディポネクチン 低タンパク質栄養 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、タンパク質栄養状態に応じて変動する代謝の連携システムを明らかにするために、タンパク質代謝制御機構のみならず、糖・脂質代謝の制御機構について研究を進めてきた。その結果、摂取するタンパク質の量を制限すると体内のインスリン感受性の上昇が起こることを明らかにした [Toyoshima Y *et al*, *J Mol Endocrinol* 32: 519 (2004)、*Growth Horm IGF Res.* 18: S23 (2008)、*J Mol Endocrinol* 45: 329 (2010)]。この詳細なメカニズムを理解するために、代謝の中心的役割を果たしているインスリン標的組織に注目して、低タンパク質食摂取時のインスリンシグナルと糖・脂質代謝の動向を調べた。その結果、肝臓でインスリンシグナルが増強するとともに、肝臓中性脂肪量が増加していた。しかしながら、何が低タンパク質栄養状態を感知してインスリン感受性を上昇させるかは不明のままであった。

本研究開始当初、申請者は、低タンパク質食摂取によりアディポネクチンの血中濃度が上昇することを見出していた。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの一つであり、インスリン感受性を上昇させ、糖尿病、高血圧、動脈硬化といった生活習慣病の発症を抑える働きがある。それ故、アディポネクチンが低タンパク質栄養状態を感知して、肝臓のインスリン感受性を上昇させるのではないかと考えられた。

他方、非アルコール性脂肪肝の患者では血中アディポネクチン濃度が低く、非アルコール性肝炎への進行に伴い、さらに血中アディポネクチン濃度が低下すると報告されている [Savvidou S *et al*, *J. Clin. Gastroenterol.* 43: 765 (2009)、Hui JM *et al*, *Hepatology* 40: 46 (2004)、Pagano C *et al*, *Eur. J. Endocrinol* 152: 113 (2005)]。これは、血中アディポネクチン濃度が肝臓の脂質蓄積量と逆相関することを示しており、低タンパク質食摂取時に、血中アディポネクチン濃度が高いにもかかわらず、肝臓中性脂肪量が増加するという申請者の発見と矛盾している。したがって、アディポネクチンは、低タンパク質栄養状態によって起こる肝臓の脂質蓄積量増加から重度の脂肪肝、肝炎へのさらなる病態進展を防ぐために増加する、とも考えられた。

以上の結果を総合すると、「低タンパク質食摂取によって起こる代謝異常を、アディポネクチンの増加によって調節されたインスリンシグナルおよび糖・脂質代謝が補償して、恒常性を維持する」と考えられた。本研究で、この因果関係を明らかにすることは、タンパク質栄養状態に応答した代謝の連携機構を明らかにする上で不可欠だけでなく、栄養状態に応答したアディポネクチンの新しい制御機構と生理的役割の解明につながることを期待した。

2. 研究の目的

本研究では、次の2点の解明を目的とした。

(1) 低タンパク質栄養状態が、どのような機構を介して、血中アディポネクチン濃度を上昇させるか。

(2) タンパク質食摂取によるアディポネクチンの経時的变化やアディポネクチン欠損マウスに低タンパク質食を給餌した際の、糖・脂質代謝やインスリンシグナルの変動を解析することにより、低タンパク質栄養状態に応答したアディポネクチン増加が糖・脂質代謝の制御にどのような役割を果たすか。

3. 研究の方法

1) 低タンパク質栄養状態に応答したアディポネクチン増加機構の解明

脂肪組織におけるアディポネクチン増加機構の解析

これまで申請者らが行ってきた実験条件と同様に、6週齢のWistar系雄ラットを、1日のタンパク質必要量を満たす標準食として15%カゼイン食(15C)を給餌する群と1日のタンパク質必要量に満たない5%カゼイン食(5C)を給餌する群の2群に分け、14日間飼育した。実験15日目に麻酔下で白色脂肪組織および褐色脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織より全RNAを抽出し、アディポネクチン mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。また、脂肪組織よりタンパク質抽出液を調整し、アディポネクチンタンパク質量をイムノプロット法で測定した。

必須アミノ酸によるアディポネクチン増加の直接制御の検討

低タンパク質食給餌により血中必須アミノ酸濃度が低下する。この低下が白色脂肪細胞に直接的に作用してアディポネクチンを増加させるのか検討した。

常法に従って分化させた3T3-L1脂肪細胞を無血清培地で一晚培養後、必須アミノ酸含有培地と非含有培地で24~48時間培養し、培地中および細胞内のアディポネクチン量をイムノプロット法で測定した。

ホルモンによるアディポネクチン増加の直接制御の検討

低タンパク質食給餌による血中ホルモンの変化が、脂肪細胞からのアディポネクチン分泌量を増加させるか検討した。ラットに低タンパク質食を給餌した際、線維芽細胞成長因子(FGF)21の血中濃度は上昇し、インスリンとインスリン様成長因子(IGF)-Iの血中濃度は低下する [Takahashi S *et al*, *Br. J. Nutr.* 63: 521 (1990)、Thissen JP, *et al*, *Endocr Rev.* 15: 80 (1994)、Ozaki Y *et al*,

Br. J. Nutr. 114: 1410 (2015)].

そこで、分化させた 3T3-L1 脂肪細胞を無血清培地で一晚培養後、上記ホルモンを添加した培地あるいは添加しない培地で 24 時間培養し、培地中のアディポネクチン量をイムノプロット法で測定した。

(2) 低タンパク質栄養状態に応答したアディポネクチン増加の生理的意義の解明

低タンパク質食を給餌したアディポネクチン欠損マウスの解析

アディポネクチン欠損マウス[Maeda N *et al*, *Nat Med* 8: 731 (2002)]は、研究協力者である大阪大学大学院医学系研究科の下村伊一郎博士より分与していただき、以下の実験を行った。

野生型(購入した野生型もしくはアディポネクチン欠損マウスから交配して得られた野生型)とアディポネクチン欠損マウス(KOマウス)を、研究方法(1)と同様に、それぞれ 15C と 5C の 2 群に分けて 14 日間飼育する。実験期間中に、耐糖能試験およびインスリン耐性試験を行い、酸素消費量(VO_2)も測定した。実験最終日に 4~6 時間絶食後に麻酔下で眼窩より採血し、得られた血液サンプルを用いて内分泌・代謝指標を測定する。同時にインスリン標的組織のうち、肝臓、骨格筋を摘出し、肝臓・筋肉中の中性脂肪量、各組織における糖・脂質代謝を調節している酵素やインスリンシグナルや栄養シグナル因子の量や活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 低タンパク質栄養状態に応答したアディポネクチン増加機構の解明

脂肪組織におけるアディポネクチン増加機構の解析

14 日間の低タンパク質食給餌によって起こる血中アディポネクチン量の増加は、特に高分子量アディポネクチンの増加によることがわかった。また、白色脂肪組織と褐色脂肪組織中のアディポネクチン mRNA 量およびタンパク質量は、低タンパク質食給餌によって変化しなかった。

以上の結果から、低タンパク質食給餌による血中アディポネクチン濃度の増加は、脂肪細胞での合成促進によって起こるのではなく、脂肪細胞からの分泌促進もしくは血中での分解抑制によって起こると考えられた。

必須アミノ酸によるアディポネクチン増加の直接制御の検討

3T3-L1 脂肪細胞を必須アミノ酸欠乏培地で 24 時間~48 時間培養すると、必須アミノ酸含有培地で培養した場合と比べて培地中のアディポネクチン量は減少するが、細胞内のアディポネクチン量は変化しなかった。したがって、培地中の必須アミノ酸が欠乏すると、脂肪細胞でのアディポネクチン合成量は

変わらないが、脂肪細胞から培地中への分泌量が低下することが分かった。

以上の結果から、ラットに低タンパク質食給餌した際の血中アディポネクチンの増加は、利用できる必須アミノ酸の低下を脂肪細胞が直接感知して起こるのではないことが示唆された。

ホルモンによるアディポネクチン増加の直接制御の検討

3T3-L1 脂肪細胞を、インスリンおよび IGF-1 を添加した培地で 24 時間培養すると、添加しない培地で培養した場合と比べて、培養液中のアディポネクチン量は減少した。3T3-L1 脂肪細胞を、FGF21 を添加した培地で 24 時間培養しても、培地中のアディポネクチン量は変わらなかった。

したがって、低タンパク質食給餌による血中アディポネクチン量の増加に、血中インスリンや IGF-1 量の減少が関与することが示唆された。

(2) 低タンパク質栄養状態に応答したアディポネクチン増加の生理的意義の解明

低タンパク質食を給餌したアディポネクチン欠損マウスの解析

低タンパク質食を給餌した際に起こる血中アディポネクチンの増加は、ラットで観察された結果であった。そこで、アディポネクチン欠損マウス(KOマウス)を使用する前に、購入した野生型(C57BL/6)マウスに低タンパク質食を給餌した際に血中アディポネクチンが増加するか検討した。その結果、ラットの場合と比べると増加する割合は低かったが、低タンパク質食を給餌した C57BL/6 マウスでは、標準食を給餌した C57BL/6 マウスと比べて、血中アディポネクチンが約 1.2~1.5 倍有意に増加していた(ラットでは、標準食給餌に比べて低タンパク質給餌した場合、血中アディポネクチンは約 2~5 倍増加)。また、ラットの場合と同様に、低タンパク質食を給餌した C57BL/6 マウスでは、酸素消費量(VO_2)の増加とインスリン感受性の上昇が観察された。したがって、低タンパク質食給餌によって増加する血中アディポネクチンが、 VO_2 の増加やインスリン感受性の上昇に寄与するか、マウスでも検討が可能であることがわかった。

そこで、次に、KO マウスから交配して得られた野生型(WT)マウスおよび KO マウスに、標準食もしくは低タンパク質食を給餌した。その結果、ラットや C57BL/6 マウスの場合と同様に、WT マウスでも、低タンパク質食給餌によって、血中アディポネクチンが増加した。しかし、ラットや C57BL/6 マウスで起こる、低タンパク質食給餌による VO_2 の増加やインスリン感受性の上昇は、WT マウスでは起こらなかった。これらの結果から、低タンパク質栄養状態における血中アディポネクチンの増加は、 VO_2 の増加やインスリン感受性の上昇

に寄与しないと考えられた。

しかし、C57BL/6 マウスと WT マウスとで低タンパク質食給餌によって起こる生理応答が全く異なっていたこともあり、今回の実験だけでは、低タンパク質栄養状態における血中アディポネクチン増加の生理的役割を明らかにできなかった。また、ラットと比べてマウスでは低タンパク質食給餌による血中アディポネクチンの増加の程度が低いことも併せて考えると、KO マウスを用いた系で実験を継続することは困難であると判断した。今後、低タンパク質栄養状態に应答した血中アディポネクチン増加の生理的意義を明らかにするためには、ラットを用いた新たな実験系を構築すべきと結論した。

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2件)

(1) Toyoshima Y, Tokita R, Taguchi Y, Akiyama-Akanishi N, Takenaka A, Kato H, Chida K, Hakuno F, Minami S & Takahashi S. Tissue-specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation in growing rats. *Endocr J* 61. 499-512. 2014 査読有り

(2) Ozaki Y, Takeda T, Akanishi N, Hakuno F, Toyoshima Y, Takahashi S & Takenaka A. Insulin injection restored increased insulin receptor substrate (IRS)-2 protein during short-term protein restriction but did not affect reduced insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA or increased triglyceride accumulation in the liver of rats. *Biosci Biotech Biochem* 78. 130-138. 2014 査読有り

[学会発表](計7件)

(1) Toyoshima Y, Tokita R, Taguchi Y, Yoshizawa F, Takahashi S, Kato H, Minami S Protein malnutrition increases the amount and phosphorylation of 4E-binding protein 1 (4E-BP1) to accumulate lipid in rat liver. 12th Asian Congress of Nutrition, May 2015, Yokohama, Japan

(2) Taguchi Y, Toyoshima Y, Tokita R, Kato H, Takahashi S, Minami S Insulin-induced acetyl-CoA carboxylase alpha is responsible for triglyceride accumulation in primary hepatocytes of low protein diet-fed rats. 12th Asian Congress of Nutrition, May 2015, Yokohama, Japan

(3) 西宏起、山中大介、亀井宏泰、森友美、豊島由香、竹中麻子、潮秀樹、千田和広、伯野史彦、高橋伸一郎 アミノ酸欠乏をシグナルとした肝臓特異的な脂質蓄積の新機構の

解明. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会合同大会), 2015年12月、兵庫

(5) 豊島由香, 時田玲子, 田口雄亮, 高橋伸一郎, 加藤久典, 南史朗 (2014) 低タンパク質栄養状態におけるエネルギー消費量の亢進は血中アディポネクチン量の増加を介して起こる. 第8回アミノ酸学会, 2014年11月、東京

(6) 田口雄亮, 豊島由香, 時田玲子, 加藤久典, 高橋伸一郎, 南史朗 低タンパク質給餌ラットから単離した肝細胞ではインスリン依存性 acetyl-CoA carboxylase 遺伝子発現の増加が増強する. 第68回日本栄養・食糧学会大会, 2014年5月、北海道

(7) 豊島由香, 時田玲子, 田口雄亮, 高橋伸一郎, 加藤久典, 南史朗 低タンパク質栄養による血中アディポネクチン増加機構の解析. 第7回日本アミノ酸学会学術大会, 2013年11月、熊本

[その他]

ホームページ等

<http://home.nms.ac.jp/ig/seitai/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 由香 (豊島由香)

(TOYOSHIMA, Yuka)

日本医科大学先端医学研究所・講師

研究者番号: 70516070