

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450442

研究課題名(和文) TGF-ファミリーシグナルの調節によるイヌ脂肪細胞の機能制御

研究課題名(英文) Functional regulation of canine adipocytes through TGF-beta family signaling

研究代表者

舟場 正幸 (Funaba, Masayuki)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40238655

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)：様々な品種のイヌ55頭のALK3ならびにALK7遺伝子配列を調べたが、ヒトで指摘されている肥満関連SNPはイヌでは認められなかった。脂肪細胞に対してTGF- β 1, アクチビンA, アクチビンB, BMP4あるいはBMP7処理を行ったところ、脂肪細胞特異的トリグリセリドリパーゼの発現レベルは上昇した。TGF- β ファミリーは脂肪細胞の遊離アミノ酸含量に影響を及ぼすこと、インスリンによるアルギニン、グルタミン酸、フェニルアラニン含量の減少はTGF- β 1, アクチビンA, アクチビンBによって増強することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated SNPs on ALK3 and ALK7 genes using a total of 55 dogs of various breeds, which have been shown to relate to obesity in humans; no SNPs were detected. Treatment with TGF- β 1, activin A, activin B, BMP4 or BMP7 increased expression level of adipose triglyceride lipase. TGF- β family affected cellular content of free amino acids in adipocytes. Especially, insulin-induced decrease in cellular content of arginine, glutamic acid and phenylalanine was exaggerated by TGF- β 1, activin A and activin B.

研究分野：分子栄養学

キーワード：脂肪細胞 イヌ TGF-ファミリー

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肥満とは体脂肪が過剰に蓄積された状態のことを指し、高血圧、糖尿病、高脂血症の誘発因子である。したがって、肥満の予防（解消）が健康の維持に重要であることは疑いようもない。脂肪組織の増加は白色脂肪細胞数の増加ならびに肥大化によって起こり、過剰のエネルギーは白色脂肪細胞内に脂肪として蓄積され、必要に応じて脂肪は分解される。一方、褐色脂肪細胞は白色脂肪細胞から放出された脂肪酸、自身が蓄えている脂肪、ならびに糖を消費する；褐色脂肪細胞は、特異的に Ucp1 を発現することにより、これらが持つエネルギーを熱に変換する (*Physiol Rev*, 84: 277. 2004)。つまり、エネルギー代謝調節上、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞は正反対の機能を有しており、これら二種類の脂肪細胞が適切に働くことにより、肥満は予防できる。
- (2) イヌにおいても肥満は深刻な問題である (*Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 36: 1345. 2006)。イヌの肥満しやすさは、品種によって異なるものの、品種差の根本原因は不明である (*J Anim Sci*, 91: 2949. 2013)。継続的な β_3 -アドレナリン受容体活性化により、イヌ皮下脂肪組織では、Ucp1 発現ならびに酸素消費量が増加した (*Res Vet Sci*, 85: 214. 2008)。この結果は、白色脂肪組織中に褐色脂肪細胞が出現することを示唆している。しかしながら、交感神経系の継続的な活性化による肥満の予防は現実的な手段ではない。
- (3) TGF- β ファミリーは、TGF- β 群、アクチビン群、BMP 群、GDF 群に大別される細胞成長・分化因子群で、多岐にわたる生物現象を制御する。I 型と II 型受容体からなる受容体に結合した後、リガンド-II 型受容体複合体が I 型受容体を活性化し、情報を細胞内に伝える。したがって、細胞内情報伝達上、下流に位置する I 型受容体が細胞機能の制御を決定する。しかしながら、リガンド-受容体の組合せに関して、例外があり、I 型受容体間の機能的差異に関して、不明な点が多い (*Trends Cell Biol*, 19: 385. 2009)。
- (4) TGF- β ファミリーは、白色ならびに褐色脂肪前駆細胞の分化過程において中心的な役割を果たしている (*J Vet Med Sci*, 72: 373. 2010; *Endocr Rev*, 32: 387. 2011; *Biochim Biophys Acta*, 1830: 5027. 2013; *Cytokine*, 64: 138. 2013)。しかしながら、分化した脂肪細胞における TGF- β ファミリーの役割は未知である。
- (5) 血漿 TGF- β 1 濃度と肥満度を示すボディ

マス指数に正の関係があること (*Cell Metab*, 14: 67. 2011)、肥満者の脂肪組織における ALK3 (BMP・GDF 群の I 型受容体) の発現レベルは正常人と比べて高いことが報告されている (*Diabetes*, 58: 2119. 2009)。さらに、ALK7 (I 型受容体) 遺伝子変異ならびに遺伝子発現レベルは肥満と関係すること—野生型 ALK7 遺伝子を発現するマウスは、むしろ肥満しやすく、322 番目のアミノ酸をコードする塩基に変異があるマウスは肥満しにくい—、肥満の程度と脂肪組織中の ALK7 mRNA レベルは相関すること、が明らかにされている (*Diabetes*, 62: 115. 2013)。

- (6) これらの研究は個体での表現型解析が中心のため、TGF- β ファミリーの作用点、つまり、標的細胞は明確でなく、分子機構の詳細も不明である。

2. 研究の目的

- (1) 『TGF- β ファミリーのシグナル調節を通して、脂肪細胞の機能制御が可能になるのではないか?』という仮説を立てた。この仮説の検証が本研究の目的である。
- (2) 動物病院に来院する様々な品種のイヌより採血を行い ALK3 ならびに ALK7 遺伝子の塩基配列を調べる。
- (3) 去勢・避妊目的に動物病院に来院する様々な品種のイヌの性腺周囲組織より RNA を単離し、リアルタイム RT-qPCR 法により TGF- β ファミリーを含む脂肪細胞関連遺伝子発現を検討する。
- (4) TGF- β ファミリーが脂肪細胞の機能・代謝に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 動物病院に来院した様々な品種の健康なイヌより末梢血単核細胞を単離し、ALK7 遺伝子配列を決定する。
- (2) 去勢・避妊手術目的で動物病院に来院したイヌの性腺周囲脂肪組織中の TGF- β ファミリーを含む脂肪細胞関連遺伝子発現を RT-qPCR 法により測定し、肥満との関連を調べる。
- (3) イヌ脂肪組織より間質脈管系細胞を単離し脂肪細胞への分化を試み、TGF- β ファミリーの役割を検討する。
- (4) 3T3-L1 脂肪細胞に様々な TGF- β ファミリーを処理し、脂肪細胞の機能ならびに代謝産物濃度を網羅的に検討する。

4. 研究成果

- (1) 23 品種、55 頭のイヌの ALK3 ならびに

ALK7 遺伝子の肥満と関連する遺伝子変異の有無を探索したが、いずれの遺伝子に関しても遺伝子変異は認められなかった。

- (2) 19 品種、37 頭のイヌの性腺周辺脂肪組織の脂肪代謝関連遺伝子発現と肥満要因との関係性について検討した。回帰分析の結果、ボディコンディションスコア(BCS)とレプチンの間には正の相関が見られた一方、アディポネクチンとの間には負の相関が見られた。BCSが増加するとレプチン発現量は増加し、アディポネクチン発現量は減少する傾向が見られた。
- (3) HSL 発現に関して、メスの方がオスより低かった。犬種を1日の必要運動量が多い、どちらでもない、少ない品種に分類した結果、必要運動量が多いグループのイヌほどアディポネクチン発現量は有意に少ない一方、BMP4 発現量は有意に多かった。
- (4) イヌ脂肪組織より単離した間質脈管細胞を脂肪細胞に分化させる方法を確立した。
- (5) 3T3-L1 白色脂肪細胞分化の過程における TGF- β ファミリーに対する受容体発現を検討したところ、ALK1, ALK6 を除く全ての受容体発現が検出された。
- (6) 白色脂肪細胞に対して TGF- β 1, アクチビン A, アクチビン B, BMP4 あるいは BMP7 処理を行ったところ、いずれの処理によっても脂肪分解の責任遺伝子である ATGL の発現レベルは上昇した。また、 β -アドレナリン受容体活性化に伴う脂肪分解を調べたところ、TGF- β 1 処理を行った場合、脂肪分解が促進された。さらに、アクチビン A はアディポカインの一つであるレプチン発現を亢進した。
- (7) TGF- β ファミリーが白色脂肪細胞の代謝をどのように調節しているかを把握するため、まず、インスリンが白色脂肪細胞における代謝産物濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、インスリンによってクエン酸回路を構成する代謝産物の濃度が増加し、遊離アミノ酸濃度は総じて減少した。
- (8) また、クエン酸回路を構成する代謝産物濃度は2時間周期で変動した。
- (9) TGF- β ファミリーが白色脂肪細胞の機能をどのように調節しているかを網羅的に検討したところ、TGF- β ファミリーは脂肪細胞の遊離アミノ酸含量に影響を及ぼすこと、インスリンによるアルギニン、グルタミン酸、フェニルアラニン含量の

減少は TGF- β 1、アクチビン A、アクチビン B によって増強することが明らかになった。

- (10) 一方、グルタミン濃度は BMP4 あるいは BMP7 によって減少した。さらに、クエン酸回路を構成する代謝物濃度は、TGF- β ファミリーによって変化しなかった一方、インスリンによるクエン酸回路代謝物量の増加をアクチビン A、BMP4 ならびに BMP7 は増強した。これらの結果は、TGF- β ファミリーはリガンド依存的に脂肪細胞の代謝を調節することを示唆している。

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1件)

- (1) Qiao Y, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Modulation of the cellular content of metabolites in adipocytes by insulin. *Mol Cell Endocrinol.* 424:71-80. 2016. doi: 10.1016/j.mce.2016.01.017. (査読有)

[学会発表](計2件)

- (1) Qiao Y, Suenaga M, Matsui T, Funaba M. Modulation of adipocyte activity by the TGF- β family. The 12th Asian Congress of Nutrition. 2015. 5.16. Pacifico Yokohana (Yokohama)
- (2) 喬 宇航・金森耀平・松井 徹・舟場正幸. TGF- β による脂肪細胞の機能制御. 第31回日本微量栄養学会学術集会. 2014.6.7. 関西大学(吹田)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0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0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

舟場正幸 (FUNABA, Masayuki)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40238655

(2) 連携研究者

村上賢 (MURAKAMI, Masaru)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号：80271360