

## エネルギー消費の亢進を目指した肥満予防法の開発

所 属 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 生活習慣病研究部  
研究者 笠岡（坪山） 宣代

### 要旨

熱産生を高める脱共役蛋白質（UCPs）を脂肪組織および筋肉に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成した。脂肪組織での UCP2 過剰発現は、肥満／糖尿病／高脂血症を改善した。しかし、筋肉での UCP3 過剰発現はこれらの疾患を改善しなかった。

### 1. 研究目的

肥満は、糖尿病等の生活習慣病を惹起する最大の危険因子である。特に内臓脂肪蓄積型肥満は皮下脂肪蓄積型に比べ生活習慣病と関連が深く、インスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病を発症する。しかしながら、内臓肥満は筋肉や肝臓でも脂肪の蓄積を伴うことが多く、どの組織の脂肪蓄積が生活習慣病の発症に関与するのか明らかになっていない。本研究では、UCPs を過剰発現させることにより、これらの組織特異的に内臓脂肪の蓄積量を減少させたモデル動物を作成する。肝臓、筋肉、脂肪等のどの組織で、どの程度、どのように（サイズの減少または細胞数の減少）脂肪の蓄積量を抑制すると糖尿病を防止できるか明らかにする。作成したモデル動物を用いて高脂肪食負荷や運動負荷を行い、遺伝素因と生活習慣の理想的なあり方を模索する。さらに、UCPs の発現を増加させる新たな食事成分を探し出す。

従って、本研究の最大の意義は、内臓脂肪蓄積型肥満の中で糖尿病を惹起しやすいタイプを特定できること、さらにヒトに応用が可能な肥満予防法を開発できることである。

### 2. 研究方法

UCP2 および UCP3 の cDNA を筋肉特異的なエンハンサー（ミオシンライトチェーンエンハンサー）、脂肪組織特異的なエンハンサー（aP2 エンハンサー）、肝臓特異的なエンハンサー（Serum amyloid p protein エンハンサー）それぞれに組み入れ、SV40 poly A シグナルを 3' 末端に付加したコンストラクトを作成し、DNA 断片を受精卵に挿入しトランスジェニックマウスを作成する。サザンブロット法によりコンストラクトのコピー数を確認した後、作成したトランスジェニックマウスで UCPs の mRNA（ノーザンブロット法）およびタンパク質発現量（ウエスタンブロット法）が増加しているかどうか測定する。UCPs を過剰に発現させたそれぞれの組織で、中性脂肪の蓄積量が減少していることを確認する。また、動物用メタボリックチャンバーを用いてエネルギー消費量（酸素消費量）を測定し、in vivo での UCPs の機能を確認する。

組織特異的な変化が認められたトランスジェニックマウスとその同腹野生型マウスに高脂肪食（脂肪エネルギー比 60%）または、高炭水化物食（脂肪エネルギー比 10%）を約 6 ヶ月間摂取させ、高脂肪食摂取によって発症する肥満／糖尿病／高脂血症が改善されるか否か検討する。肥満の判定には体重、脂肪組織重量（内臓脂肪組織、皮下脂肪組織）、DEXA 法による体脂肪率を用い、糖尿病の判定には血糖、血漿インスリン値、インスリン負荷試験および糖負荷試験の結果を用いる。また、高脂血症の判定には血漿中性脂肪、コレステロール等を用いる。

### 3. 研究成果

#### 1) 脂肪組織特異的 UCP2 過剰発現トランスジェニックマウスの作成と解析

脂肪組織特異的なエンハンサー (aP2 エンハンサー) にヒト UCP2 cDNA を組み込んだコンストラクトを作成し、受精卵に挿入しトランスジェニックマウスを作成した (FAT-UCP2)。サザンブロット解析により、transgene が約 10 コピー挿入された 1 つのマウスラインが得られた事を確認した。ノーザンブロット解析により、FAT-UCP2 トランスジェニックマウスでは外来性 UCP2 mRNA が白色脂肪組織および褐色脂肪組織のみで発現している事を確認した (1.5-2 倍)。また、外来性 UCP2 の蛋白質も褐色脂肪組織および単離脂肪細胞で発現していた。

さらに、FAT-UCP2 トランスジェニックマウスと野生型マウスに高脂肪食を5ヵ月間負荷したところ、FAT-UCP2 トランスジェニックマウスでは高脂肪食誘導性の体重増加、脂肪組織重量の増加、インスリン抵抗性、血中中性脂肪の増加が有意に改善された。この時、酸素消費量は野生型マウスに比べ FAT-UCP2 トランスジェニックマウスでは約10%増加していた。

以上の結果から、脂肪組織に UCP2 を軽度過剰発現させることは肥満/糖尿病/高脂血症の改善に効果的であることが明らかとなった。

### 2) 筋肉特異的 UCP3 過剰発現トランスジェニックマウスの作成と解析

筋肉特異的なエンハンサー (ミオシンライトチェーンエンハンサー) にヒト UCP3 cDNA を組み込んだコンストラクトを作成し、受精卵に挿入しトランスジェニックマウスを作成した (Muscle-UCP3)。サザンブロット解析により、transgene が約 10 コピー挿入された 1 つのマウスラインが得られた事を確認した。ノーザンブロット解析により、Muscle-UCP3 トランスジェニックマウスでは外来性 UCP3 mRNA が骨格筋でのみ発現している事を確認した (1.5-2 倍)。

さらに、Muscle-UCP3 トランスジェニックマウスと野生型マウスに高脂肪食を約6ヶ月間摂取させたところ、Muscle-UCP3 トランスジェニックマウスも野生型マウスと同程度に肥満とインスリン抵抗性を発症した。酸素消費量は野生型マウスと Muscle-UCP3 トランスジェニックマウスに違いは認められなかった。

以上の結果から、筋肉に2倍程度 UCP3 を過剰発現させても肥満/糖尿病/高脂血症の発症を軽減させることは出来ないことが示唆された。

### 3) 肝臓特異的 UCP2 過剰発現トランスジェニックマウスの作成

肝臓特異的なエンハンサー (Serum amyloid p protein エンハンサー) にヒト UCP2 cDNA を組み込んだコンストラクトを作成し、受精卵に挿入し、トランスジェニックマウスを作成した (Liver-UCP2)。PCR 法にてゲノムへの外来遺伝子の挿入を確認したところ、PCR positive な独立した4つのマウスラインが得られたことを確認した。

## 4. 考察・まとめ

これまでの研究から、UCPs (特に UCP2) のエネルギー消費/熱産生における機能が注目されていたが、実際に *in vivo* で UCP2 がエネルギー消費亢進に寄与しているか否かは不明であった。本研究において、脂肪組織と筋肉で同程度 (2 倍程度) UCPs を過剰発現させた結果、脂肪組織で UCP2 を過剰発現させた場合のみ高脂肪食誘導性の肥満/糖尿病/高脂血症の発症を有意に改善した。本研究の成果により、初めて *in vivo* で UCP2 が熱産生を増加させていることが明らかとなり、UCP2 が肥満の予防/治療に有用であることが示唆された。

今後は、本年度作成した肝臓における UCP2 過剰発現トランスジェニックマウスの解析を行い、肝臓での脂肪蓄積の増加が肥満/糖尿病の発症に関与しているか否か検討するとともに、肝臓、筋肉、脂肪組織それぞれに UCPs を過剰発現させたトランスジェニックマウスを比較検討し、どの組織の脂肪蓄積量を減少させると肥満/糖尿病/高脂血症の発症を最も防止出来るか明らかにする。また、脂肪組織で UCP2 の発現増加

を惹起する新たな食事成分を探索し、肥満の新規予防法に応用したい。

## 5. 研究発表

### 論文発表

1. Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka and Osamu Ezaki (2001) Mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) in skeletal muscle. *Front Biosci* 6, D570-D574.
2. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 7, 941-946.
3. Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, and Kadowaki T (2001) Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 108, 1001-13.
4. Mayumi Takahashi, Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka, Teruyo Nakatani, Masami Ishii, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani and Osamu Ezaki (2002) Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR $\alpha$  activation and ROS production. *Am. J. Physiol.* 282, G338-G348.
5. Teruyo Nakatani, Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka, Mayumi Takahashi, Shinji Miura and Osamu Ezaki (2002) Mechanism for PPAR $\alpha$  activators-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem.* 277, 9562-9569.
6. Shinobu Ikeda, Hiromi Miyazaki, Yuko Kai, Yasutomi Kamei, Shinji Miura, Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka and Osamu Ezaki (2002) Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 395-400.
7. Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka, Hiromi Miyazaki, Seiichi Kasaoka and Osamu Ezaki (2003) Increasing the amount of fat in a conjugated linoleic acid-supplemented diet reduces lipodystrophy in mice. *J. Nutr.* in press.

### 学会発表 (筆頭のみ)

1. 笠岡 (坪山) 宜代, 中込圭, 高橋真由美, 仲谷照代 and 江崎治 (2001) UCP2 過剰発現トランスジェニックマウスの解析— 遺伝性肥満(KK $\Delta$ y)に対する影響—. 第55回日本栄養・食糧学会, 京都, 5月.
2. 笠岡 (坪山) 宜代, 中込圭, 高橋真由美, 仲谷照代 and 江崎治 (2001) 肥満、糖尿病、高脂血症の発症に及ぼすUCP2 過剰発現の影響. 第33回日本動脈硬化学会, 東京, 6月.
3. Nobuyo Tsuboyama-kasaoka, Mayumi Takahashi, Kei Nakagomi, Teruyo Nakatani and Osamu Ezaki. (2001) Mice overexpressing human uncoupling protein 2 (UCP2) in adipose tissues prevents high fat diet-induced obesity and diabetes. 17th International Congress of Nutrition, Austria, August.
4. 笠岡 (坪山) 宜代 and 江崎治 (2001) 摂取脂肪レベルの違いによる共役リノール酸 (CLA) の肥満/糖尿病に対する影響. 第48回日本栄養改善学会, 大阪, 10月.
5. 笠岡 (坪山) 宜代, 宮崎裕美 and 江崎治 (2002) 共役リノール酸 (CLA) の適正摂取条件に関する検討およびSREBP1を介した肝臓脂肪蓄積メカニズムの解析. 第56回日本栄養・食糧学会, 札幌, 7月.
6. Nobuyo Tsuboyama-kasaoka, Yasutomi Kamei, Shinji Miura, Mayumi Takahashi and Osamu Ezaki. (2002) Low level overexpression of UCP2 in adipose tissues up-regulates PGC-1 and ameliorates high fat diet-induced obesity and metabolic abnormalities. 9th International congress on obesity, Brazil, August.

7. 笠岡（坪山）宜代 and 笠岡誠一（2003）熱産生における運動と栄養. 第 10 回日本健康体力栄養研究会, 東京, 1 月.

8. 知的所有権の取得状況

（ア）特許取得

なし

（イ）実用新案登録

なし

（ウ）その他

なし