

2. 学会発表

1. 中原正子、松山さと子、過足芳子、中村直子、佐伯晃一、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類（サル・ヒト）ES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞・血管内皮細胞分化。日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。
2. 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類ES細胞から分化誘導した好中球の機能解析。日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。
3. 中原正子、佐伯久美子、松山さと子、佐伯晃一、中村直子、過足芳子、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、湯尾 明：カニクイザルおよびヒトES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
4. 中村直子、過足芳子、佐伯久美子、中原正子、佐伯晃一、松山さと子、湯尾 明：カニクイザルES細胞からの無フィーダー培養条件下における継代培養可能な血管内皮細胞への分化誘導。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
5. 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、末盛博文、中辻憲夫、佐伯久美子、湯尾 明：ヒトES細胞から分化誘導した好中球の機能解析。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

特願2006-303929

2. 実用新案登録

なし

図1

細胞内活性酸素類 (Reactive Oxygen Species, ROS) の測定

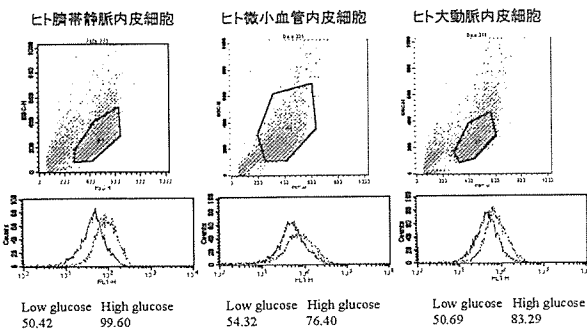


図2

NACによる高ブドウ糖濃度誘導ROSの阻害効果
(ヒト臍帯静脈内皮細胞)

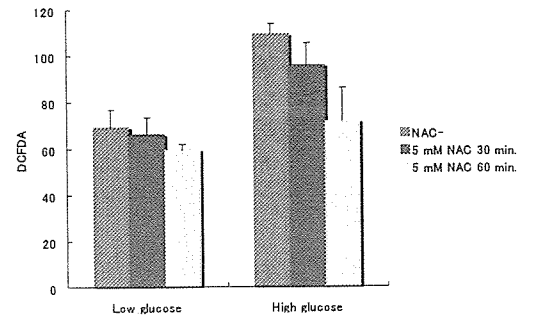


図3

ヒト血管内皮細胞内のGSH(グルタチオン)

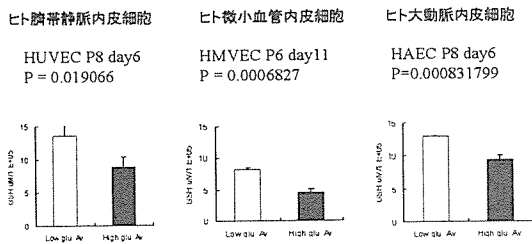


図4

ヒト血管内皮細胞内のAGE (advanced glycation end-product)

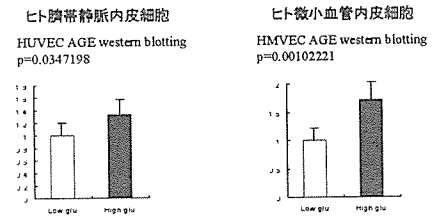


図5

ヒト血管内皮細胞の索状構造形成能

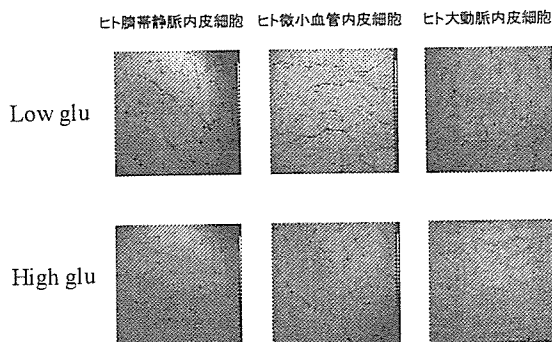


図6

高ブドウ糖濃度ヒト血管内皮細胞のマイクロアレー解析

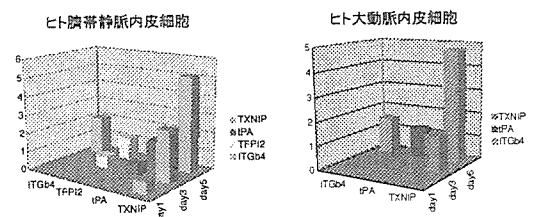


図7

サルES細胞からの血管内皮細胞分化

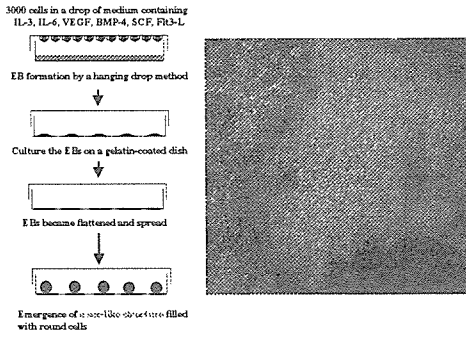


図8

サルES細胞からの血管内皮細胞分化

サルES細胞から分化誘導した血管内皮細胞の形態

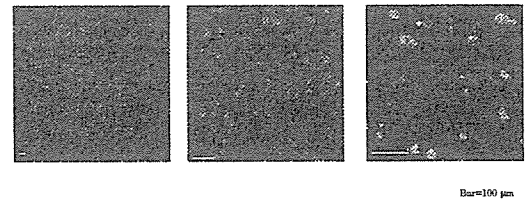


図9

サルES由来血管内皮細胞とヒト血管内皮細胞との形態比較

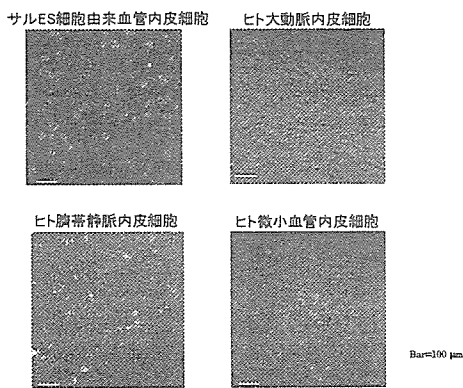


図10

サルES由来血管内皮細胞のCadherin発現

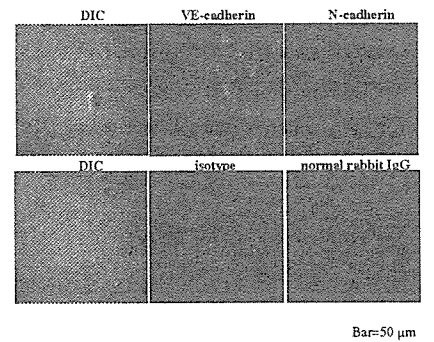


図11

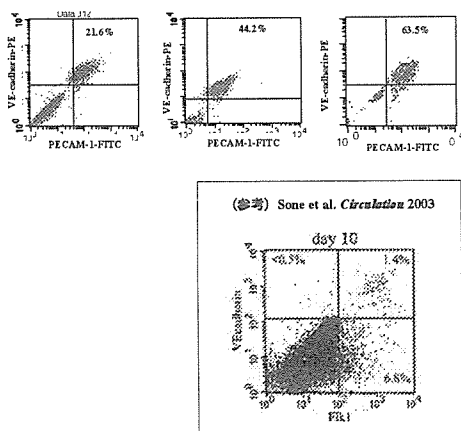


図12

血管内皮細胞としての機能のアッセイ

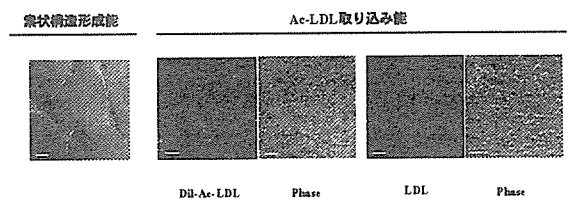


図13

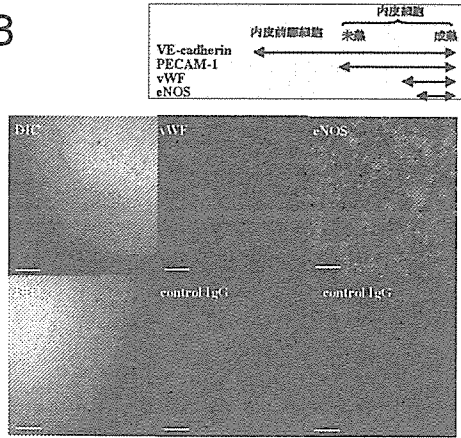


図14

ヒトES細胞からの血管内皮細胞の分化誘導

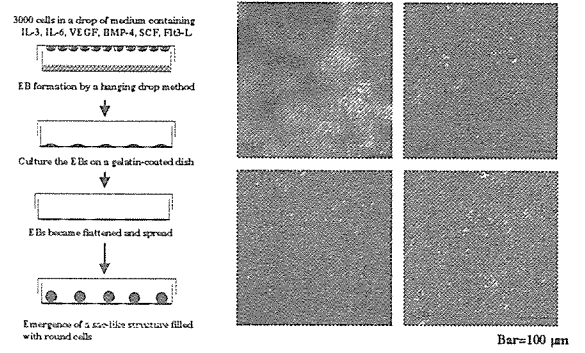
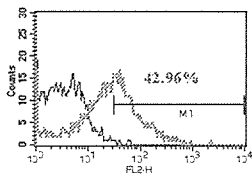


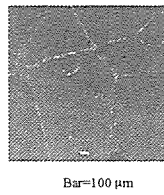
図15

ヒトES細胞からの血管内皮細胞の分化誘導

細胞表面VE-cadherin発現



索状構造形成能



糖尿病モデルを用いた個体レベルの病態解析

分担研究者 岡村 匡史 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨： LEA/Sendai ラットは Long-Evans Agouti (LEA)ラットコロニーから分離した、非肥満型糖尿病ラットである。本研究ではこのラットのインスリン分泌不全病態に着目し、その病態を解析した。その結果、8週齢の膵島では病理学的な変化は観察されず、 β 細胞量および膵臓におけるインスリン含有量も顕著な低下はみられないが、インスリン分泌能は明らかに低下しており、膵島の機能不全が先天的に存在する事を明らかにした。さらに定量的 RT-PCR および GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、Sendai ラットに特徴的な遺伝子発現パターンを解析した。

A. 研究目的

糖尿病は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合う多因子疾患である。その病像は多彩でしかもきわめて長い経過を経て発症・進展し、病態が変遷していく。そのため、交配や飼育条件の操作により、遺伝因子と環境因子の効果を経時的に調べることができるモデル動物は、糖尿病研究において非常に有用なツールである。我々は非肥満とインスリン分泌能低下を主徴とし、日本人ヒト2型糖尿病に酷似した非常にユニークなモデルラット（LEA/Sendai、以下 Sendai ラット）を新たに開発した。Sendai ラットの病態を詳細に解析することにより、ヒト糖尿病の病態モデルを確立する。また経時的な病態解析により、病期診断マーカーの開発を目指す。

B. 研究方法

(1) 動物

1996年、東北大学医学部（現大学院医学系研究科）附属動物実験施設にて飼育されていた Long-Evans Agouti (LEA)ラットコロニーから多飲多尿個体が発見された。その後、このコロニーのラットに対し糖負荷試験を行い、120分血糖値が200mg/dl以上の雄ラットを選び、兄妹交配により系統化した。2005年に国

立国際医療センター研究所動物実験施設に導入し、以後も同様に兄妹交配により系統維持している。本研究では Sendai ラット F14-17 世代を用いた。対照群は、Brown Norway (BN) および F344 ラット (Japan SLC Inc.) を用いた。すべての動物は Specific Pathogen Free (SPF) で飼育され、照明は12時間の明/暗サイクル、飼育室の温度は $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿 $40 \pm 10\%$ であった。飼料 (CE2 standard diet; 346.8kcal/100g; CLEA Japan Inc.) および水は自由摂取させた。

(2) 経口糖負荷試験および血中インスリン濃度の測定

16～17時間絶食させたラットに、グルコース2g/kg体重になるよう経口投与し、0、30、60、90および120分後にそれぞれ尾静脈から採血した。血糖値はグルテスト R 血糖測定機 (Sanwa kagaku kenkyusho, Co., Ltd) で測定した。血中インスリン濃度は遠心により血漿を分離後、インスリン測定キット (Morinaga Milk Industry Co., Ltd) を用いて、ELISA法により同定した。

(3) インスリン陽性面積の定量

4%パラホルムアルデヒドで固定した膵臓を、OCT Compound に包埋し、クライオスタ

ットにて薄切した。凍結切片を 30 分間風乾後、PBS で洗浄 (×3)。0.6% H_2O_2 メタノール溶液で 30 分間ブロッキングし、PBS で洗浄した (×3)。5%Goat Serum (DAKO,X0907) で 5 分間反応後、一次抗体 (Anti-Insulin, DAKO,A0564, 1000 倍希釈) を室温で 60 分間反応させた。PBS で洗浄した後 (×3)、二次抗体 (Goat Anti-Guinea Pig IgG,CHEMICON, AQ108P, 1000 倍希釈) を室温で 60 分間反応させ、PBS (×3) 蒸留水 (×3) で洗浄後、DAB 染色 (3.3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, Nacalai tesque 11009-41,10mg を 0.05M Tris Buffer(pH7.6) 50ml, H_2O_2 50 μ l に溶解し染色液とした) した。ヘマトキシリン (MUTO, 3000-2) で染色後、水洗、脱水、透徹してエンテランニュー (MERCK, OB540325) を用いて封入した。

メチルグリーン/Insulin 染色された膵切片の Islet 面積を画像解析ソフト WinROOF (MITANI CORPORATION) を用いて測定し、インスリン陽性面積/膵臓全体面積 (%) として算出した。

(4) 遺伝子発現解析

ラットを麻酔薬にて安楽死後、各組織を取り出し、QIAGEN RNeasy Micro(膵島; 約 200 個)および Mini(肝臓、腎臓; 10mg) kit を用い、プロトコール(DNase 処理を含む)に従って Total RNA を抽出した。膵島はコラゲナーゼ法を一部改良した方法により単離後した (Ohara-Imaizumi, M. et al., Biochem. J., 2004)。発現遺伝子の網羅的解析は、Affimetrix 社 GeneChip システムのプロトコールに従い、cRNA プローブを調整し、GeneChip Rat Expression Array 230A (28,757 genes, 30,248 transcripts) を用いて解析した。Applied Biosystems 社 TaqMan プローブおよび 7900HT を用いたリアルタイム RT-PCR により、遺伝子の発現量を定量した。

(5) 血中脂質解析

3-4 時間絶食後、ラット尾錠脈から血液

を採取し、遠心により血清を分離した。血清中の遊離脂肪酸は、NEFA C-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, LTD.) にて測定した。血中コレステロールおよびトリグリセリドプロファイルは、ゲルクロマトグラフィー法を用いて分析した (Hara, I and Okazaki, M. Methods in Enzymology, 1986)。

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には、動物実験計画書を国立国際医療センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を講じた。

C. 結果

(1) Sendai ラットにおける耐糖能異常およびインスリン分泌不全病態

Sendai 雄ラットでは、経口糖負荷後 30 分値の血糖値は 8 週齢で既に有意に高く、120 分値は加齢と共に上昇していた (図 1A)。一方雌では、8 週齢では雄と同様耐糖能異常が見られるものの、加齢に伴う耐糖能の悪化は観察されなかった (図 1B)。糖負荷後の耐糖能に関しては、明らかな性差があった。

Sendai 雄ラットの糖負荷後の血中インスリン濃度は、24 週齢では 15 分値で正常コントロールに比べ有意に低く、48 週齢では 30 および 60 分測定値が正常コントロールに比べ有意に低かった (図 2)。

(2) Sendai ラットの初期病態解析

4 および 8 週齢の病理学的検索では、雌雄とも膵島に顕著な病変は見られなかったが、12 週齢では、雄の膵島の一部で好中球を主体とした軽度の炎症細胞浸潤像、および線維化が観察された。

4 週齢の Sendai ラットに経口糖負荷試験を行ったところ、すでに耐糖能低下が見られ、

特に糖負荷後30分血糖値の上昇が顕著であった。8週齢でも同様の傾向が観察され、これらの週齢では、糖負荷後の血糖値に雌雄差は見られなかった(図3A)。8週齢雄ラットでは、糖負荷15分後の血中インスリン濃度が有意に低下していた(図3B)。腹腔内糖負荷試験においても、Sendai雄ラットでは、著しい耐糖能低下および血中インスリン濃度の低下が観察された(図4)。しかし、8週齢の膵島では病理学的な変化は観察されず、 β 細胞の割合、 β 細胞1個あたりの大きさもコントロールと比べ、有意な差はなかった。膵臓1個あたりのインスリン含量は、BNとの比較では有意に低下しているが、F344系統は差がないことから、顕著なインスリン含量の低下はないと判断した。

(3) 遺伝子発現解析

Sendaiラットの糖尿病病態から類推される候補遺伝子の発現量をTaqManプローブを用いた定量的RT-PCR法により検討した。30遺伝子の発現を膵島、肝臓または腎臓で検索したところ、7遺伝子で発現量の増加が見られ、2遺伝子では減少していた。

さらにGeneChipにより、Sendaiラットの膵島、肝臓および腎臓の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、膵島、肝臓および腎臓で共通して、変動している遺伝子が14個存在した。興味深いことに、肝臓および腎臓でコレステロール代謝に関わる遺伝子の発現量が、BNラットと比べ約4倍上昇していたため、24週齢の血中脂質濃度を測定したところ、Sendaiラットでは血中コレステロールおよび遊離脂肪酸が有意に上昇していた。トリグリセリド濃度には、有意な差はなかった(表1)。

D. 考察

ヒト2型糖尿病は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合い発症する。遺伝様式も単純なメンデル遺伝を示すことは少なく、複数の遺伝因子が関与する多因子遺伝病の代表といえ

る。Sendaiラットの糖尿病も単純なメンデル遺伝には従わない。Sendaiラットと非糖尿病のBNラットを交配したF2世代の糖負荷後血糖値の量的形質遺伝子座(Quantitative Trait Loci; QTL)解析により、少なくとも3つの耐糖能異常関連遺伝子座の存在が明らかとなっている。F1世代の糖負荷後血糖値を測定すると、興味深いことに8週齢および16週齢のF1ラットでは、SendaiとBNラットのほぼ中間の血糖値を示すのに対し、24週齢では、BNラットとほぼ同じ血糖値を示した。Sendai雄ラットでは、加齢と共に膵島の数およびサイズは共に減少するが、若齢に見られるインスリン分泌低下およびこれに起因すると考えられる耐糖能の低下は、劣性遺伝子ではなく、優性あるいは半優性の遺伝子(群)が関わっている事が示唆された。またこれらの遺伝子(群)は、膵島の量やインスリン含有量を規定する遺伝子ではなく、 β 細胞の質的な機能に関わる遺伝子であると類推される。

ヒトの2型糖尿病では、グルコース負荷に対する「早期インスリン分泌」が、遺伝的に規定され、かつ将来の糖尿病発症リスクを高める形質として注目されている。さらに、日本人2型糖尿病の70~80%が遺伝的・体質的素因によるインスリン分泌不全から糖尿病を発症するとされている。Sendaiラットは、高血糖発症前からインスリン初期分泌能低下が存在し、正常コントロールに比べ血中インスリン濃度が低かった。糖尿病に見られる経口糖負荷後のインスリン初期分泌能低値は、膵島 β 細胞からの第一相のインスリン分泌の低下を反映しており、 β 細胞からのインスリン分泌を解析するための、優れたモデルになると考えられた。さらに、インスリン分泌不全は高血糖になる前から観察されることからブドウ糖毒性の影響を排除した解析が可能である。

Sendaiラット8週齢で見られる耐糖能異常は、消化管から分泌され膵 β 細胞に作用するインクレチンの関与も考えられたが、腹腔内糖負荷試験においても、著しい耐糖能低下お

よび血中インスリン濃度の低下が観察されたことから、インクレチンが直接的に関与している可能性は低いと考えられた。8週齢の腓島では病理学的な変化は観察されず、β細胞量および膵臓におけるインスリン含有量も顕著な低下はみられないことから、膵島の機能不全が先天的に存在する事が推察された。今後は単離膵島を用いた解析、およびスルフォニル尿素剤・カルシウムチャンネル開口薬などを用いて、このラットにおけるインスリン分泌不全病態を、分子レベルおよび遺伝子レベルで解析していく予定である。

Genechip を用いた遺伝子発現解析より、膵島、肝臓および腎臓で共通して、変動している遺伝子が14個存在した。ラットはデータベースの整備が遅れているため、アノテーションがつかない遺伝子が含まれるが、これらの遺伝子は Sendai ラット糖尿病発症メカニズムを解明するための、重要な情報であり、ヒト糖尿病にも応用できる可能性がある。また、コレステロール合成に関与する遺伝子の発現量が、約4倍が増加しており、血中コレステロールが、コントロール系統に比べ1.5~2倍増加していることを見いだした。Sendai ラットは糖尿病だけでなく、脂質代謝モデルラットとなる可能性もあり、さらに経時的な血中脂質プロファイルの解析を進めていく予定である。

E. 結論

糖尿病は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合い、その病態は非常に複雑な多因子疾患である。そのため、一定の環境下で飼育でき、かつ遺伝的コントロールが可能なモデル動物は、糖尿病研究の強力なツールとなる。特にラットはマウスとヒトの間を埋める動物として重要視されており、自然発症モデルラットの利用価値は高い。Sendai ラットは日本人2型糖尿病に酷似した非常にユニークなモデルラットである。このラットの病態を詳細に解析することにより、日本人の2型糖尿病に特徴的なインスリン分泌不全のメカニズムを解

明する、有用なモデル動物となることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Akagawa, K. and Nagamatsu, S.: Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis. J. Biol. Chem. in press.

2. 学会発表

(国内)

(1) 岡村 匡史、新矢 恭子、矢延 理絵子、三好一郎、笠井憲雪：「新たな非肥満糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットの初期病態解析」第53回日本実験動物学会総会、2006年5月、神戸

(2) 岡村 匡史：「新しい糖尿病モデル (LEA/SENDAI) ラットの特徴とその有用性」第14回動物細胞工学シンポジウム、2006年8月、東京

(3) 岡村 匡史：「新規インスリン分泌低下型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットの解析」第五回東京インスリン分泌研究会、2006年9月、東京

(4) 岡村 匡史、矢延理絵子、谷口繁生、清水有紀子、新矢恭子、安田和基、笠井憲雪：「非肥満型糖尿病モデル LEA/SENDAI ラットのインスリン分泌不全病態」第21回日本糖尿病動物研究会、2007年2月、盛岡

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

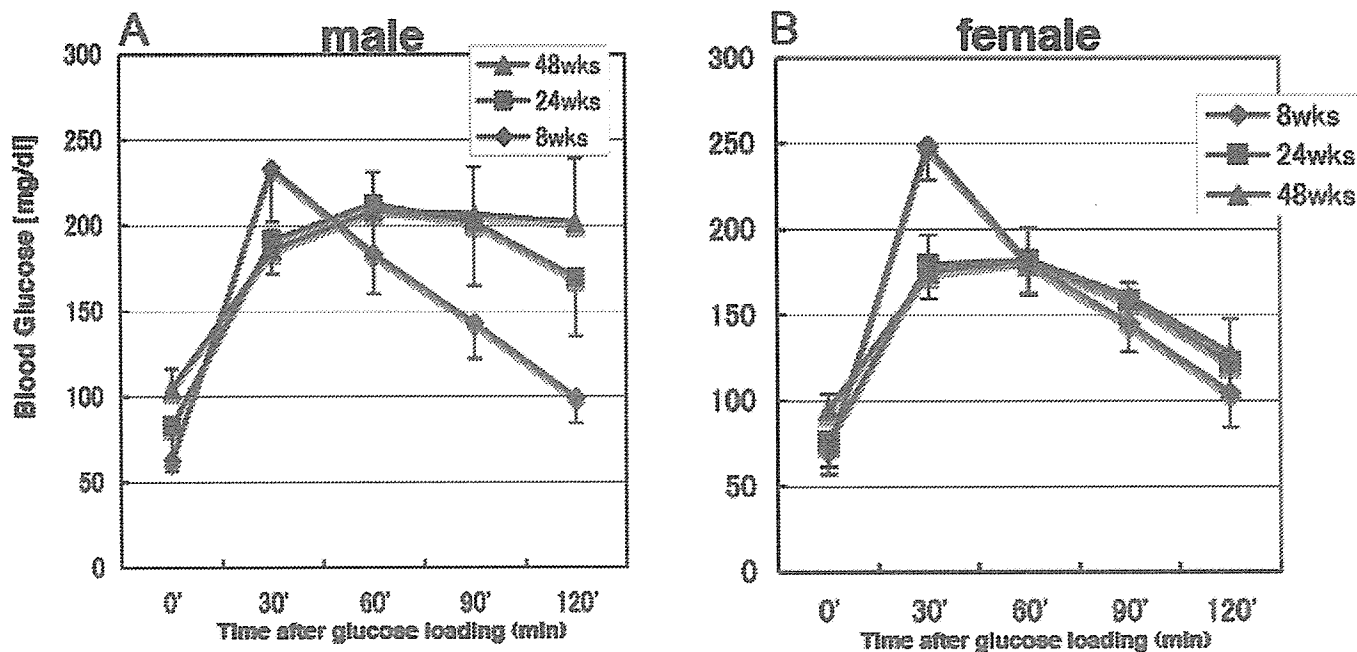
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし
3. その他
なし

図1 経口糖負荷後血糖値の変化 (2g/Kg glucose)



糖負荷後の血糖値推移には、明らかな性差がある。

図2 経口糖負荷後血中インスリン濃度の変化

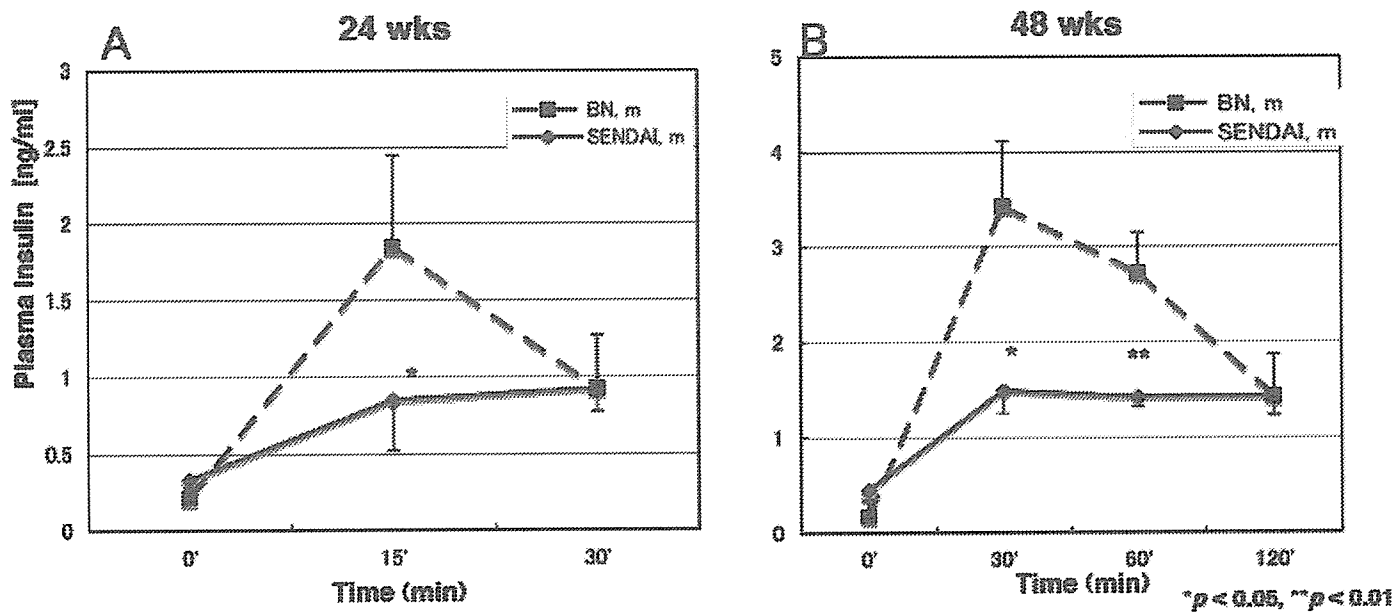


図3 8週齢雄ラットにおける経口糖負荷後血糖値および血中インスリン濃度の変化

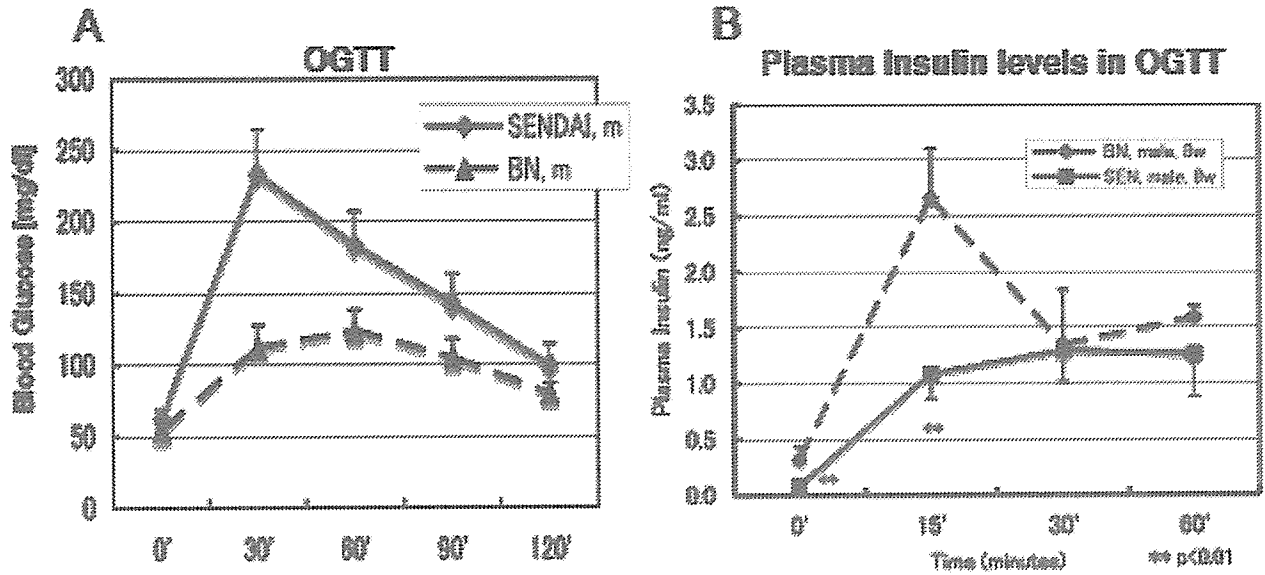


図3 8週齢雄ラットにおける腹腔内糖負荷後血糖値および血中インスリン濃度の変化

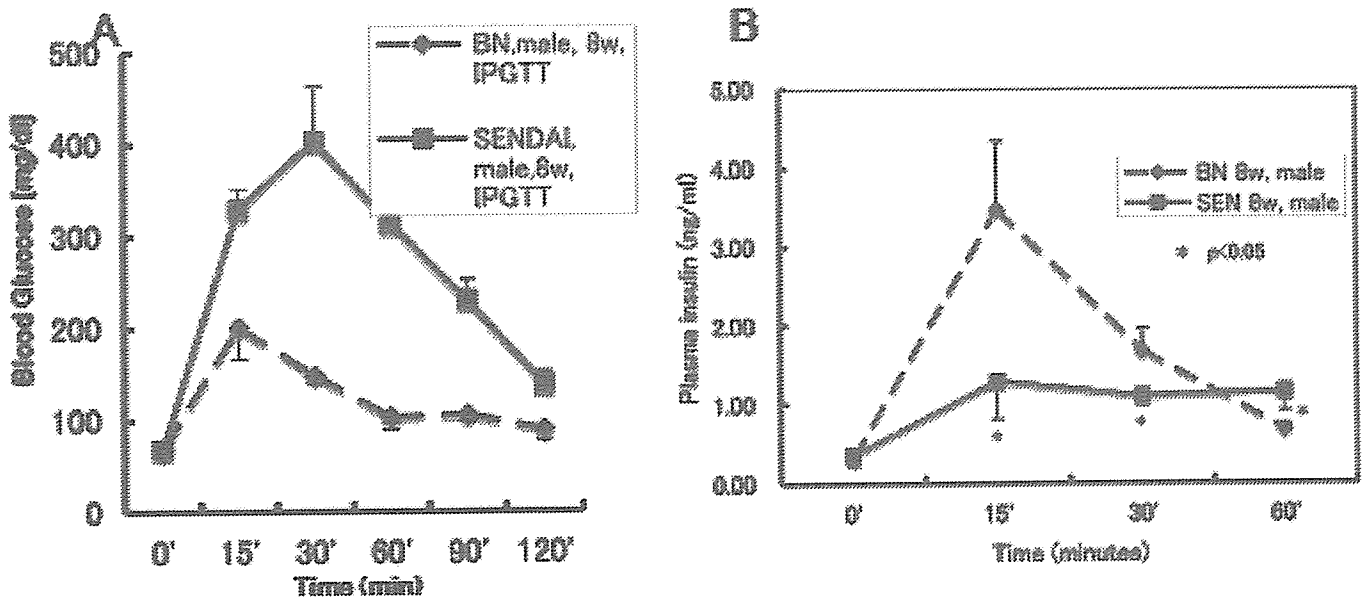


表1 24週齢雄ラットの血中脂質濃度

24w	コレステロール [mg/dL]	中性脂質 [mg/dL]	FFA [mEq/l]
Sandai, male	88.7 ± 8.3	58.7 ± 32.1	1.37 ± 0.15
EN, male	61.2 ± 3.4 **	60.9 ± 11.5	1.11 ± 0.04 *

Mean ± SD
* < 0.05, ** < 0.001

運動の糖・脂質代謝改善機序について検討した。その結果、運動による体脂肪減少作用には骨格筋の AMPK、特に $\alpha 2$ AMPK の活性化が必要であることがわかった。また、運動による糖代謝改善には、体脂肪減少以外の機序も関与していること、そのうちの一つに骨格筋での GLUT4 の発現増加が示唆された。運動による PGC-1 α 増加に交感神経系の興奮が関与していることを明らかにした。

脂肪肝はインスリン抵抗性のマーカーであり、脂肪肝予防も肥満予防とともに、糖尿病予防に重要だと考えられる。高脂肪摂取及び高スクロース（砂糖）摂取により、同程度の脂肪肝を発症するマウスモデルを作成した。脂肪肝の発症機序は原因により異なり、肝臓では高脂肪食では PPAR γ の活性化が、高スクロース摂取では SREBP-1c の活性化が認められた。予想どおり、SREBP-1c を不活性化する魚油を添加すると、高スクロース摂取による脂肪肝は予防されたが、高脂肪食による脂肪肝は増悪した。脂肪肝の成因により予防法が異なることが示された。

A. 研究目的

“運動療法”は肥満や糖尿病の予防・治療に有効であり、米国で行われている大規模調査で証明されている。運動は骨格筋における糖の取り込みを活性化させ、脂肪酸 β 酸化促進により生体内エネルギーの消費をもたらす。近年、これらの効果が AMP-activated protein kinase (AMPK) や転写共役因子の PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α) で説明できるとして注目されたが、AMPKの活性化だけでは運動による糖取り込み亢進（急性効果）を30~40%しか説明できない。

我々はこれまでに運動の長期効果 (GLUT4 増加、ミトコンドリア増加) における AMPK と PGC-1 α の役割についてトランスジェニックマウスを用いて検討し、①AMPK活性化では glucose transporter 4 (GLUT4) の発現量増加や PGC-1 α 量の増加を介したミトコンドリア機能の活性化を説明できないこと、②筋肉での AMPK 活性化が運動による抗肥満効果に必要であること。③PGC-1 α の増加だけでは GLUT4 発現量増加を説明できないこと。④PGC-1 α の増加はミトコンド

リア数を著しく増加させ、その機能の活性化に伴い脂肪の燃焼を促進して抗肥満効果を示すが、一方でインスリン抵抗性の完全な改善作用を示さないこと。⑤筋肉での PGC-1 α 発現量が交感神経活性化により40倍も増加することを明らかにした。

そこで本年度は AMPK 活性化による運動の抗肥満効果が、筋肉での脂肪燃焼の亢進によるものかどうか検討した。また、運動による PGC-1 α 発現量増加の何%が交感神経活性化によるのか明らかにするため、アドレナリン受容体アンタゴニストを投与したマウス、又はアドレナリン受容体の欠損したマウスを運動させ、PGC-1 α 発現量が何%抑制されるか調べた。

一方、摂取カロリーが過剰になるとトリアシルグリセロール (TG) が脂肪組織、肝臓、筋肉に蓄積し、肥満、脂肪肝になり糖尿病に罹りやすくなる。全身での脂肪蓄積は糖尿病罹患の予備段階であり、これらの組織で脂肪蓄積を予防法すると、糖尿病罹患を減少することが予想される。人では脂肪及び蔗糖の過剰摂取は脂肪肝や肥満を生じる。この機序を明らかにするため、脂肪肝発症

のマウスモデルを作成し、それぞれのマウス肝臓での遺伝子発現の変化を調べることにより、機序を推定し原因別の予防法を考案した。

B. 研究方法

運動の肥満およびインスリン抵抗性抑制作用への骨格筋 AMPK の役割

野生型と AMPK-DN マウスにそれぞれ、脂肪エネルギー比 56.7%の高脂肪食を1ヶ月間与えて肥満にし、さらに1ヶ月以上の間、高脂肪(HF)食を与えながら「運動をさせる群(運動群)」と特に運動を強制させない「安静群」に分けて、体重変化、体脂肪率、脂肪組織重量や、インスリン抵抗性(経口糖負荷試験、インスリントランス試験)などを指標に運動の効果への AMPK の役割について調べた。また、対照として高炭水化物(HC)食を与えて運動を強くない群を設けた。運動は、水泳を1日30分 x 4セットおこなった。10週齢のマウスに HC 食および HF 食を8週間与え、そのマウスについてエアタイトトレッドミルを用い、運動時の酸素消費量と二酸化炭素排出量を間接カロリーメトリ法により測定し、呼吸商を算出した。

運動による骨格筋でのPGC-1 α 発現増加機序の解析

マウスに β 受容体遮断薬のpropranololを皮下投与し、投与1時間後よりトレッドミル運動を45分間させた。また、 β 1,2,3受容体ノックアウトマウスに運動を45分間させた。それぞれの群に対するコントロールマウスを同じトレッドミル上で走らせ、運動終了3時間後に骨格筋におけるPGC-1 α 発現量を調べた。

高スクロース摂取及び高脂肪食による脂肪肝に対する10en%魚油の効果

マウス(♂、7週齢)をスターチ食(10en%脂肪(全てサフラワー油)を含むエサ、飲み物は水)のコントロール群;高スクロース食群(10en%脂肪(全てサフラワー

油)を含むエサ、20%スクロース水);高脂肪食群(60en%脂肪(全てサフラワー油)を含むエサ、飲み物は水)の3群にそれぞれに対し、10en%魚油を添加した群、添加しない群の計6群に分け、11週間飼育した。解剖を行い、体重及び各組織重量、肝臓TG量、血糖値、血中NEFA濃度、血中TG、アディポネクチン、インシュリン濃度、肝臓でのSREBP1c及びそのtarget遺伝子、PPAR γ 及びそのtarget遺伝子、PPAR α 及びそのtarget遺伝子等の発現量について調べた。

C. 研究結果

(1) 運動の肥満およびインスリン抵抗性抑制作用への骨格筋AMPKの役割

高脂肪食負荷した安静群ではいずれのマウスでも同じように体脂肪は増加したが、運動をさせた群では野生型マウスでは体脂肪が減少したのにもかかわらず、AMPK-DNマウスでは体脂肪は減らなかった(図1左)。運動時の呼吸商を測定すると、AMPK-DNマウスで糖質の利用亢進が認められ、このマウスでは運動のためのエネルギーを糖質に頼りがちで、脂質燃焼が低下していることが示唆された(図1右)。

(2) 運動による骨格筋でのPGC-1 α 発現増加機序の解析

45分間のトレッドミル走行を行うと、運動終了3時間後をピークとして骨格筋のPGC-1 α の発現は増加したが、この増加は β 受容体遮断薬propranolol前投与で69%抑制された(図2)。同様の結果は、 β 1,2,3受容体ノックアウトマウスでも認められ、運動による骨格筋でのPGC-1 α 発現増加は36%抑制された。

(3) 高スクロース摂取及び高脂肪食による脂肪肝に対する10en%魚油の効果

コントロール群に比べ、高スクロース摂取群、高脂肪食摂取群で肝臓TG量が有意に増加した。魚油を添加すると、高スクロース摂取群の肝臓TG増加は抑制された

が、高脂肪摂取群の肝臓 TG 量は更に増加した (図 3)。魚油添加により、血中インシュリン濃度は高脂肪食摂取群のみ増加したが他の群では減少した。血糖値は、高脂肪食摂取群で増加したが、魚油添加により減少した。

肝臓における mRNA 発現量について調べた結果、コントロール群に比べ、高スクロース食摂取群では SREBP-1c, FAS, ACC1 遺伝子の発現が増加していた。高脂肪食摂取群ではコントロール群と比較し、SREBP-1c, FAS, ACC1, GPAT 遺伝子の発現に変化がなかったが、有意ではないが PPAR γ 1, PPAR γ 2, CD36 の発現量増加認められた。魚油添加により、高スクロース摂取群で認められた SREBP-1c, FAS, ACC1 遺伝子発現が増加は抑えられたが、高脂肪摂取群では、SREBP-1a, PPAR γ 1, PPAR γ 2, CD36 発現の著明な増加が認められた。

(倫理面への配慮)

研究所の動物管理規約に従い研究を行なっている。また、動物に苦痛を与えないため、ネンブタール麻酔下で解剖を行なった。

D. 考察

骨格筋の AMPK の活性化は acyl CoA carboxylase 2 をリン酸化して、その活性を低下させ、Malonyl CoA 量を低下させる。その結果、ミトコンドリア内への脂肪酸流入量が増加し、脂肪酸の β 酸化が亢進される。本年度の検討で、AMPK-DN マウスが運動時における脂肪燃焼量が低下していること、繰り返し運動による体脂肪減少効果が減弱することがわかり、運動による体脂肪減少作用には、運動をする度に AMPK が活性化され、脂肪酸の β 酸化がその都度亢進することが必要であることがわかった。一般的に、体脂肪量が減少すると糖代謝が改善されるが、AMPK-DN マウスは運動により体脂肪量が減少していないにもかかわらず、耐糖能、インスリン抵抗性が改善された。骨格筋に GLUT4

を 2 倍程度過剰発現すると、HF 食による肥満や、肥満した ob/ob マウスにおいても糖代謝が改善されることが報告されており、今回、AMPK-DN マウスでも運動により骨格筋での GLUT4 発現量が増加していることが、体脂肪減少が認められないにもかかわらず、糖代謝が改善した理由の一つとして考えられる。

運動による PGC-1 α 増加に交感神経系の興奮が深く関与していることがわかった。 β 受容体遮断薬 propranolol 前投与で 69%抑制された。 β 1, 2, 3 受容体ノックアウトマウスでも、運動による骨格筋での PGC-1 α 発現増加は 36%抑制された。筋肉には propranolol 感受性の β 4 受容体が存在すると考えられていて、33%はこの β 4 受容体を介する効果と考えられる。Propranolol で抑制されない残りの 31%は Ca²⁺関連の刺激によるものかもしれない。

脂肪肝の発症原因は高スクロース摂取と高脂肪食摂取とでは異なり、高スクロース摂取群では SREBP-1c 系が活性化され、高脂肪食摂取群では PPAR γ 系が活性化され、脂肪肝を呈すると考えられた。このため、SREBP-1c 系を抑制する魚油は高スクロース摂取による脂肪肝には効果が認められ、高脂肪食とよる脂肪肝には効果が認められなかった。

E. 結論

AMPK-DN マウスが運動時における脂肪燃焼量が低下していること、繰り返し運動による体脂肪減少効果が減弱することがわかり、運動による体脂肪減少作用には、運動をする度に AMPK が活性化され、脂肪酸の β 酸化がその都度亢進することが必要であることがわかった。

運動による PGC-1 α 発現増加に交感神経系の興奮が関与していることを明らかにした。

更に、脂肪肝の発症機序は原因により

異なり、予防法もそれぞれに対し異なることが推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) **Taurine deficiency creates a vicious circle promoting obesity.**

Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, Ezaki O: *Endocrinology* : 147(7): 3276-3284, 2006.7

2) **Overexpression of peroxisome proliferators-activated receptor α co-activator-1 α leads to muscle atrophy with depletion of ATP.**

Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, Kita K, Nishino I, Ezaki O: *Am J Pathol* : 169(4): 1129-1139, 2006.10

3) **Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner.**

Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Yasuda K, Miura S, Ezaki O, Ogawa Y: *FEBS Lett.* : 581(1): 91-96, 2007.1.9

2. 学会発表

1) 「生活習慣病予防のための食事・運動療法の作用機序に関する研究」学会賞受賞講演

江崎治: 日本栄養・食糧学会 大会: 2006.5.19: 静岡コンベンションアーツセンター グランシップ (静岡県)

2) 「運動しても体脂肪が減らないマウス」

三浦進司、甲斐裕子、勝又阿貴、田村真弓、亀井康富、江崎治: 第60回日本栄養・食糧学会大会: 2006.5.20: 静岡県立大学 (静岡県)

3) 「タウリンの抗肥満作用メカニズム」

笠岡(坪山)宜代、所澤千香子、佐野佳

代、細川優、江崎治: 第60回日本栄養・食糧学会大会: 2006.5.21: 静岡県立大学 (静岡県)

4) **AMP-Activated Protein Kinase in Skeletal Muscle Is Required for a Reduction of Fat Mass by Exercise Training.**

Miura S, Kamei Y, Ezaki O: American Diabetes Association, the 66th Scientific Sessions: 2006.6.12: Wahington, D.C.

5) **Increased Peg1/Mest mRNA in Obese Adipose Tissue is Expressed from Paternal Allele in an Isoform-Specific Manner**

Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Ezaki O, Ogawa Y: The 11th Adipo Science Symposium: 2006.8.19: 千里阪急ホテル (大阪)

6) **Taurine deficiency creates a vicious circle promoting obesity**

笠岡(坪山)宜代、所澤千香子、佐野佳代、亀井康富、笠岡誠一、細川優、江崎治: 第10回国際肥満学会: 2006.9.5: オーストラリア (シドニー)

7) **肥満の脂肪組織におけるインプリンティング遺伝子 Peg1/Mest の発現制御機構**

亀井康富、菅波孝祥、幸田尚、石野史敏、江崎治、小野佳宏: 第27回日本肥満学会 : 2006.10.28: 神戸国際会議場 (兵庫県)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

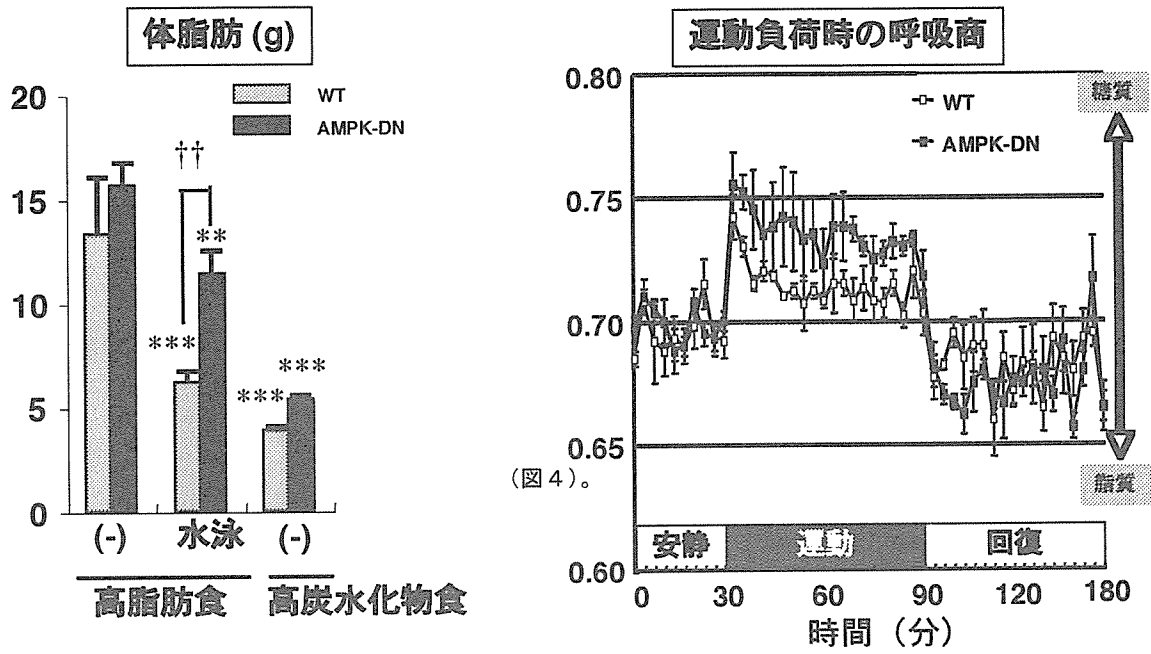
1) 山崎聖美、江崎治: 「肝臓トリグリセリド濃度低下剤」 特願番号: 2007-19573 で平成19年1月30日に出願

2. 実用新案登録なし

3. その他

なし

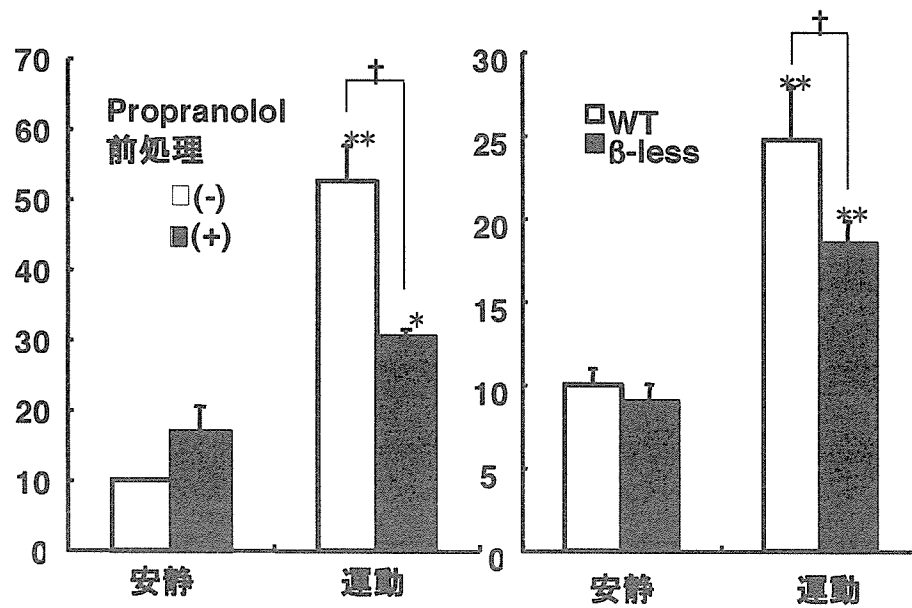
図 1



AMPK-DN マウスは運動による体脂肪減少作用が減弱していた (左図)。AMPK-DN マウスは運動時の糖質燃焼量が増加し、脂質燃焼量が低下していた (右図)。

図 2

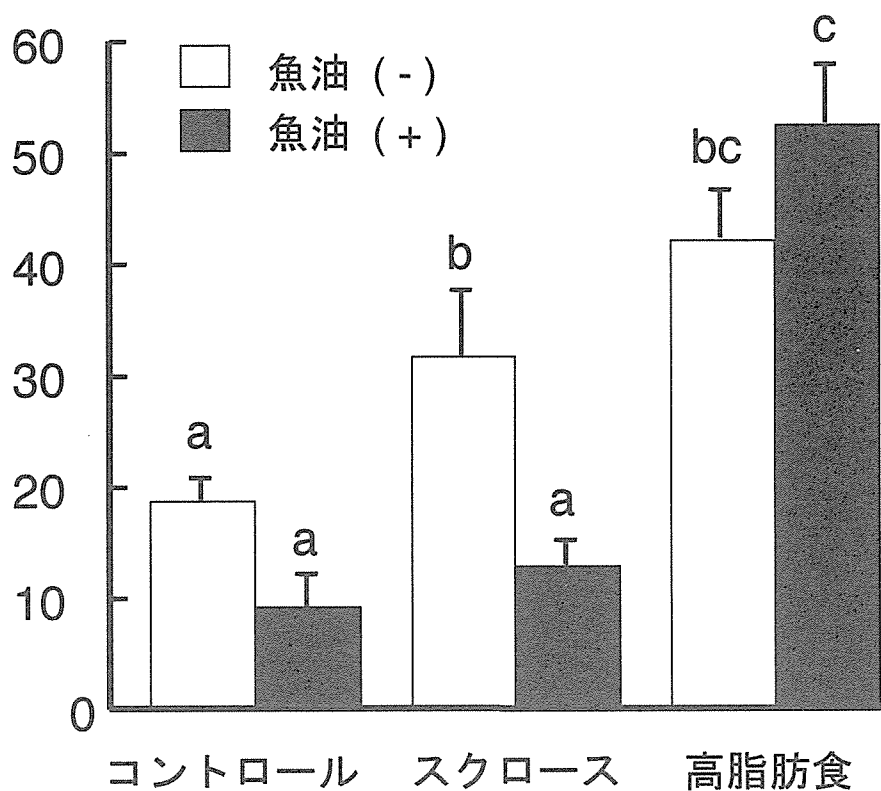
PGC-1 α mRNA 量、%



運動による PGC-1 α 増加に交感神経系の興奮が深く関与していることがわかった。 β 受容体遮断薬 propranolol 前投与で 69%抑制された。同様の結果は、 β 1, 2, 3 受容体ノックアウトマウスでも認められ、運動による骨格筋での PGC-1 α 発現増加は 36%抑制された。

図 3

肝臓での中性脂肪量 (mg/ g liver)



コントロール群に比べ、高スクロース食摂取群、高脂肪食摂取群で肝臓 TG 量が有意に増加した。魚油を添加すると、高スクロース食摂取群の肝臓 TG 増加は抑制されたが、高脂肪摂取群の肝臓 TG 量は更に増加した。共通のアルファベットがない場合、2つの群で有意差 (P < 0.05) がある。

分担研究者 浅島 誠 東京大学大学院総合文化研究科教授

研究要旨 昨年度行った新規遺伝子の単離・解析をより効率的に行うため、数種の遺伝子注入胚と細胞の薬剤処理を組み合わせた系を用い、膵臓形成法の改良を行った。その結果、より高純度な膵臓組織を高効率で誘導することができるようになった。

A. 研究目的

現在、幹細胞を用いた再生医療が提唱され、世界中で研究が行われている。糖尿病をはじめとする膵臓疾患の治療目的のためにも、こうした再生医療が重要な手段となると考えられる。ただ、内胚葉が膵臓や肝臓に分化して行く過程は非常に複雑であり、また異なる細胞間の相互

作用が起きていると考えられている。

将来的に医療への応用を考えた場合、器官誘導系の確立に直接有用なだけでなく、安全性確保の上でも、複雑な細胞分化のメカニズムを包括的に理解することが重要になってくると思われる。

我々は、ツメガエルの未分化細胞塊であるアニマルキャップを、胚葉誘導活性を持つアクチビンで処理することによっ

て、心臓・腎臓などを始め様々な器官・組織を誘導する系を確立してきた。昨年度報告したように、これらの系を応用し、アクチビンに加えビタミン A 誘導体として知られるレチノイン酸を用いて膵臓を誘導する独自の系の確立を試み、比較的高効率な膵臓の誘導が可能になった。こうして誘導可能になった膵臓組織から精製した RNA を用い、ディファレンシャルスクリーニング法によって膵臓形成に関わる遺伝子の単離を行うことにより、膵臓分化メカニズムの解明

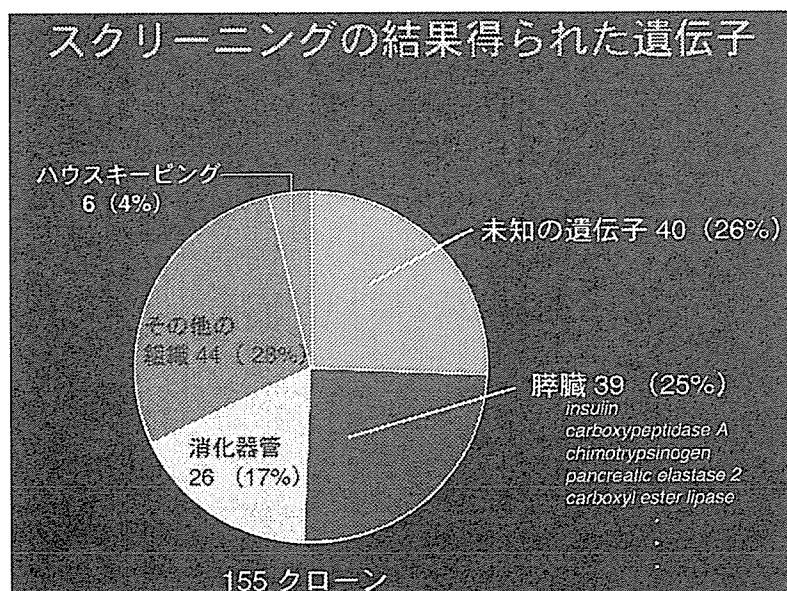


図 1 昨年度行ったスクリーニングにより得られた遺伝子のプロファイル。