

cholecystokinin 1 receptor was associated with midlife weight gain in women. The 10th International Congress on Obesity. Sydney, Australia, September 7, 2006.

安藤富士子、北村伊都子、甲田道子、大藏倫博、下方浩史：一般地域住民における腹部肥満感受性因子の網羅的検討。
第13回日本未病システム学会学術集会。
東京、2006年12月3日

下方浩史、安藤富士子、北村伊都子、甲田道子、大藏倫博：加齢とメタボリックシンドローム－年齢別にみたメタボリックシンドロームのウエスト基準値の妥当性－。
第13回日本未病システム学会学術集会。東京、2006年12月3日

G. 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

(研究協力者)北村伊都子（国立長寿医療センター疫学研究部外来研究員）

表1 解析に用いた候補遺伝子多型 (126種)

略号	遺伝子多型
ABCA	ATP-binding cassette,sub-family A (rs2230806)
ACE	Angiotensin converting enzyme (D/I)
ADD1	Alpha Adducin (G460W)
ADH	Alcohol dehydrogenase 2 (G214A)
ADR	Androgen receptor (CAG repeat)
AF7153	AF007153(unknown cDNA:rs1595066)
AGN	Angiotensinogen (C235T)
AGTR	Angiotensin II type I receptor (A1166C)
AGTR5	Angiotensin II type2 receptor (C3123A)
ALDH	Acetaldehyde dehydrogenase 2 (E/K)
ANP2	atrial natriuretic peptide(NPPA)(C-664G)
APM1	Adiponectin (G276T)
APM3	Adiponectin(C-11377G)
APOA1	apoprotein A1(APOA1)(G-75A)
APOC3	Apolipoprotein C-III (C1100T)
APOE1	Apolipoprotein E (A-491T)
APOE4	Apoprotein E (E2/E/E4)
B2ADR	β 2adrenergic receptor gene (Gln27Glu)
B3ADR	β 3 adrenoceptor (Trp64Arg)
BDKRB2	β 2 bradykinin receptor (-58T/C)
BMP4	bone morphogenetic protein 4 (C6007T)
CAL	Calcitonin receptor (C1377T)
CASR	Cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptide(A1475G)
CCK1	Cholecystokinin 1 receptor (G-128T)
CCK2	Cholecystokinin 1 receptor (A-81G)
CCR	Chemokine receptor 2 (G190A (Val64Ile))
CD14	Lipopolysaccharide receptor CD14(C-260T)
CETP	Cholesteryl ester transfer protein A1324G(Asp442Gly)
CHRM2	muscarinic cholinergic 2 receptor (A1890T)
COL	Collagen type1(G-1997T)
COMT	Catechol-o-methyltransferase(GA(Val158Met))
CP10	Calpain10(G-43A)
CYP17	cytochrome P450,family 17, subfamily A,polypeptide 1 (T-34C)
CYP19	aromatase cytochrome P-450 gene (TTTArepeat in intron4)
DAT	Dopamins transporter AG(exon 9, 1215)
DLST1	Dihydrolipoamide succinyltransferase (A19117G)
DLST2	Dihydrolipoamide succinyltransferase (T19183C)
DRD2	Dopamine receptor D2 CG(Ser311Cys)
DRD2a	dopamine receptor D2(DRD2)(A1/A2 Taq I A)
DRD4	Dopamine D4 Receptor (C-521T)
EDN1	Endothelin-1(Lys198Asn)
ESR1	Estrogen Receptor α (PP/pp)
ESR2	Estrogen Receptor α (XX/xx)
ESRA3	Estrogen receptor- α (T-1989G)
FABP2	Intestinal fatty acid-binding protein(Ala54Thr)

(表1 続き)

略号	遺伝子多型
FGB	β -Fibrinogen(G-455A)
FOXC2	Forkhead box C2 (C-512T)
FYN	protein tyrosine kinase (PTK) fyn (T137346C)
G1A3	Glycoprotein I a (A1648G(Lys505Glu))
Ghrelin	Preproghrelin (Leu72Met)
GNB	Guanine nucleotide-binding protein beta3 (C825T)
GNRH1	gonadotropin-releasing hormone 1(G/C(Try16Ser))
GP1BA	Glycoprotein I b α (C1018(Thr145Met))
GS	Glycogen Synthase(M418V)
HTR1B	5-HT1B(HTR1B)(G861C)
HTTLPR	Serotonin transporter (repeat)
IGF2R	Insulin-like growth factor II receptor A6206G(Asn2020Ser)
IGF2R2	Insulin-like growth factor 2 receptor(A5002G(Arg1619Gly))
IL10	Interleukin-10 (A-592C)
IL1A	Interleukin-1 α (C-889T)
IL1B	Interleukin-1 β (C-511T)
IL4R	Interleukin 4 receptor (G1902A(Q576R))
IL6	Interleukin-6(C-634G)
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (T587C(F196S))
IRS1	Insulin receptor substrate-1(G3494A(Gly972Arg))
KLOT	Klotho(G-395A)
LEP	Leptin(A19G)
LEPR	Leptin receptor(Gln223Arg)
LMNA	lamins A and C (T1908C)
LPL	LPL (Ser447Ter)
MAOB	Monoamine oxidaseB [GA(intron13/exon14)]
MC4	Melanocortin-4 receptor(MC-4) AG(Ile103Val)
MMP1	Matrix metalloproteinase-1 (1G/2G at-1607)
MMP12	Matrix metalloproteinase-12(A-82G)
MMP3	Stromelysin promoter (5A/6A at -1612)
MMP9	Matrix metalloproteinase-9(C-1562T)
Mt12811	MT12811 (T/C)
Mt13928	MT13928 (G/C)
Mt15497	MT15497 (G/A)
Mt15524	MT15524 (A/G)
Mt5178	Mt5178(C/A)
Mt6253	Mitochondria 6253 (T/C)
Mt8794	Mitochondria C8794T(His90Tyr)
MTH	Methylentetrahydrofolate Redutase (C677T)
MTP1	Microsomal triglyceride transfer protein (G-493T)
NAD	NADH/NADPH p22phox(242C/T(His/Try))
NOS3	Nitric Oxide Synthase3 (G894T)
NOSID	Nitric Oxide Synthase3 (ID)
OPG1	Osteoprotegerin (T245G)
OPG2	Osteoprotegerin (T-223C)

(表1 続き)

略号	遺伝子多型
OST	Osteocalcin(C298T)
PAFAH	Platelet-activating factor acetylhydrolase (G994T (Val279Phe))
PAI	Plasminogen activator inhibitor 1(4G/5G)
PAR	Peroxisome proliferator-activated receptor γ (Pro12Ala)
PGC1	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 (G A(Gly482Ser))
PON2	Paraoxonase-2 (Ser311Cys)
PONA1	Paraoxonase-1 (Gln192Arg)
PONA2	Paraoxonase-1 (Met55Leu)
PPARG3	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ 3 (C-681G)
PRC	24kDa protein of complex I (Ala29Val)
RAGE1	receptor of advanced glycationend products(AGER)(1704G/T)
RAGE2	receptor of advanced glycationend products(AGER)(2184A/G)
RIL	Reversion-induced LIM (T-333C)
S1BR	Serotonin receptor 1B(HTR1B)(A-161T)
S2AR	Serotonin receptor 2A (T102C)
SCNN1G	gamma-subunit of the amiloride-sensitiveepithelial sodium channel (SCNN1G)(G-173A)
SHIP2	SH2-containing inositol phosphatase(G-157A)
SHIP21	SH2-Containing inositol 5-phosphatase2(SHIP2)(C(+121)T)
SOD2	Superoxide dismutase 2 Val-9Ala
SRD5A	Steroid 5 α -reductase type II (V89L)
TCIRG1	T-cell immune regulator 1 (G-1102A)
TF1	Transferin (Pro570Ser)
TGF1	Transforming groth factor- β 1 (T29C)
TGF2	Transforming groth factor- β 1 (C-509T)
TNF	Tumor necrosis facter α (C-863A)
TOM40	TOM40 polymorphism SNP988 T5328C
TPH	Tryptophan hydroxylase (C218A)
UCP1	Uncoupling protein 1 (A-3826G)
UCP2	Uncoupling protein 2 (CT(Ala55Val))
VDR1	Vitamin D receptor (T2C)
VDR2	Vitamin D receptor (A-3731G)
VEGF1	Vascular endothelial growth factor (C936T)
VEGF3	Vascular endothelial Growth factor(VEGF)(C-2578A)
VEGF4	Vascular endothelial Growth factor(G-1154A)
VLDLR	VLDL receptor (triplet repeat)
WRN	Werner helicase(WRN)(c.4330TC(1367Cys/Arg))

表2 内臓肥満と遺伝子多型

(腹腔内脂肪面積もしくはウエスト囲を従属変数、遺伝子多型を説明変数、年齢を調整変数とした一般化線形モデルによる分析)

遺伝子多型	性	閉経の有無	従属変数	年齢を調整した一般化線形モデルによる遺伝子多型間の有意差 (p value)
			内臓脂肪面積 (waistct)/ウエスト周囲径(wcm)	
ADR	女性	未閉経	waistct	0.022 *
CAL	女性	未閉経	waistct	0.047 *
CP10	女性	閉経	waistct	0.021 *
CYP17	女性	閉経	wcm	0.029 *
DRD2	女性	未閉経	wcm	0.046 *
EDN1	女性	未閉経	wcm	0.041 *
EDN1	女性	未閉経	waistct	0.048 *
GNB	女性	閉経	wcm	0.045 *
GP1BA	男性		wcm	0.018 *
GP1BA	男性		waistct	0.008 **
IRAK1	女性		waistct	0.043 *
IRAK1	女性	閉経	wcm	0.031 *
IRAK1	女性	閉経	waistct	0.029 *
KLOT	男性		wcm	0.047 *
KLOT	男性		waistct	0.045 *
MMP12	男性		wcm	0.019 *
MMP12	男性		waistct	0.010 **
MAOB	女性	未閉経	wcm	0.021 *
MAOB	女性	未閉経	waistct	0.027 *
Mt15497	女性		wcm	0.013 *
Mt15497	女性		waistct	0.019 *
Mt15497	女性	閉経	wcm	0.009 **
Mt15497	女性	閉経	waistct	0.016 *
Mt15524	女性	閉経	wcm	0.049 *
Mt15524	女性	閉経	waistct	0.034 *
NOSID	男性		waistct	0.010 *
PAI	男性		wcm	0.025 *
PRC	女性	閉経	wcm	0.035 *
RAGE1	男性		waistct	0.029 *
RIL	男性		wcm	0.041 *
RIL	男性		waistct	0.007 **
TNF	男性		waistct	0.030 *
TOM40	女性		wcm	0.009 **
TOM40	女性		waistct	0.020 *
TOM40	女性	閉経	wcm	0.001 **
TOM40	女性	閉経	waistct	0.003 **
UCP1	男性		wcm	0.013 *
VDR1	女性	閉経	wcm	0.049 *
VEGF4	男性		wcm	0.008 **
VEGF4	男性		waistct	0.048 *

*,p<0.05, **,p<0.01,

proc glm;class snp ; model waistct wcm=snp age/ss2 solution;

図1 ウエスト周囲径・内臓脂肪面積平均値の遺伝子多型による差
(性別、年齢で調整)

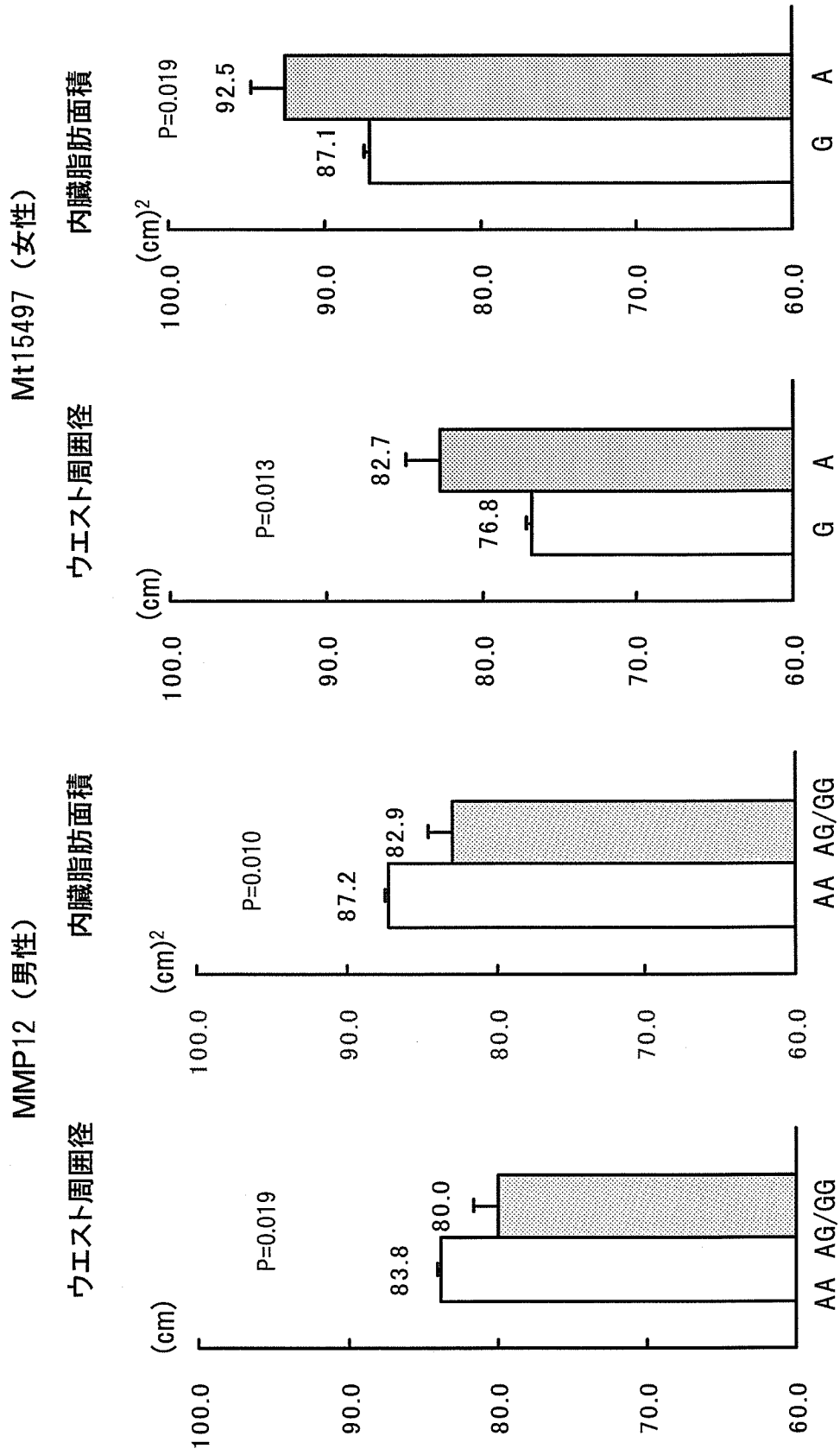


表3 性別、閉経の有無別のロジスティック解析(年齢調整)

遺伝子多型	SNP genotype	性別、閉経の有無	内臓肥満判定法	Odds比	95%CI	p value
ADR	0:SS, 1:SL/LL	女性	ウエスト周囲径	1.446	1.023 - 2.044	0.037
CYP17	0:TT, 1:TC/CC	女性	ウエスト周囲径	1.514	1.066 - 2.152	0.021
CYP17	0:TT, 1:TC/CC	閉経女性	ウエスト周囲径	1.579	1.061 - 2.349	0.024
GNB	0:CC, 1:CT/TT	閉経女性	ウエスト周囲径	1.550	1.056 - 2.275	0.025
KLOT	0:GG, 1:GA/AA	男性	ウエスト周囲径	0.755	0.580 - 0.983	0.037
MAOB	0:A, 1:G	男性	内臓脂肪面積	0.543	0.301 - 0.980	0.043
MAOB	0:A, 1:G	男性	ウエスト周囲径	0.774	0.640 - 0.936	0.008
Mt15497	0:G, 1:A	男性	ウエスト周囲径	2.030	1.025 - 4.023	0.042
Mt15497	0:G, 1:A	女性	ウエスト周囲径	3.061	1.059 - 8.846	0.039
Mt15497	0:G, 1:A	閉経女性	ウエスト周囲径	3.973	1.269 - 12.436	0.018
NOSID	0:II, 1:ID/DD	男性	内臓脂肪面積	1.859	1.104 - 3.130	0.020
UCP1	0:AA, 1:AG/GG	男性	ウエスト周囲径	1.241	1.027 - 1.501	0.026

ADR;Androgen receptor (CAG repeat), X染色体, CAG repeat23未満をS, 23以上をL (rs4045402)

CYP17;cytochrome P450;family 17, subfamily A,polypeptide 1 (T-34C) (rs743572)

GNB;Guanine nucleotide-binding protein beta3 (C825T) (rs5443)

KLOT;Klotho(G-395A) (rs1207568)

MAOB;Monoamine oxidaseB [GA (intron13/exon14)] (rs1799836)

Mt15497;MT15497 (G/A), ミトコンドリア遺伝子

NOSID;Nitric Oxide Synthase3 (Insert/Delete)

UCP1;Uncoupling protein 1 (A-3826G) (rs1800592)

図2 ロジスティック解析(性別、閉経の有無別、年齢調整済)

[結果変数 腹部肥満(WC-JもしくはWCT-J) 無:0, 有:1]

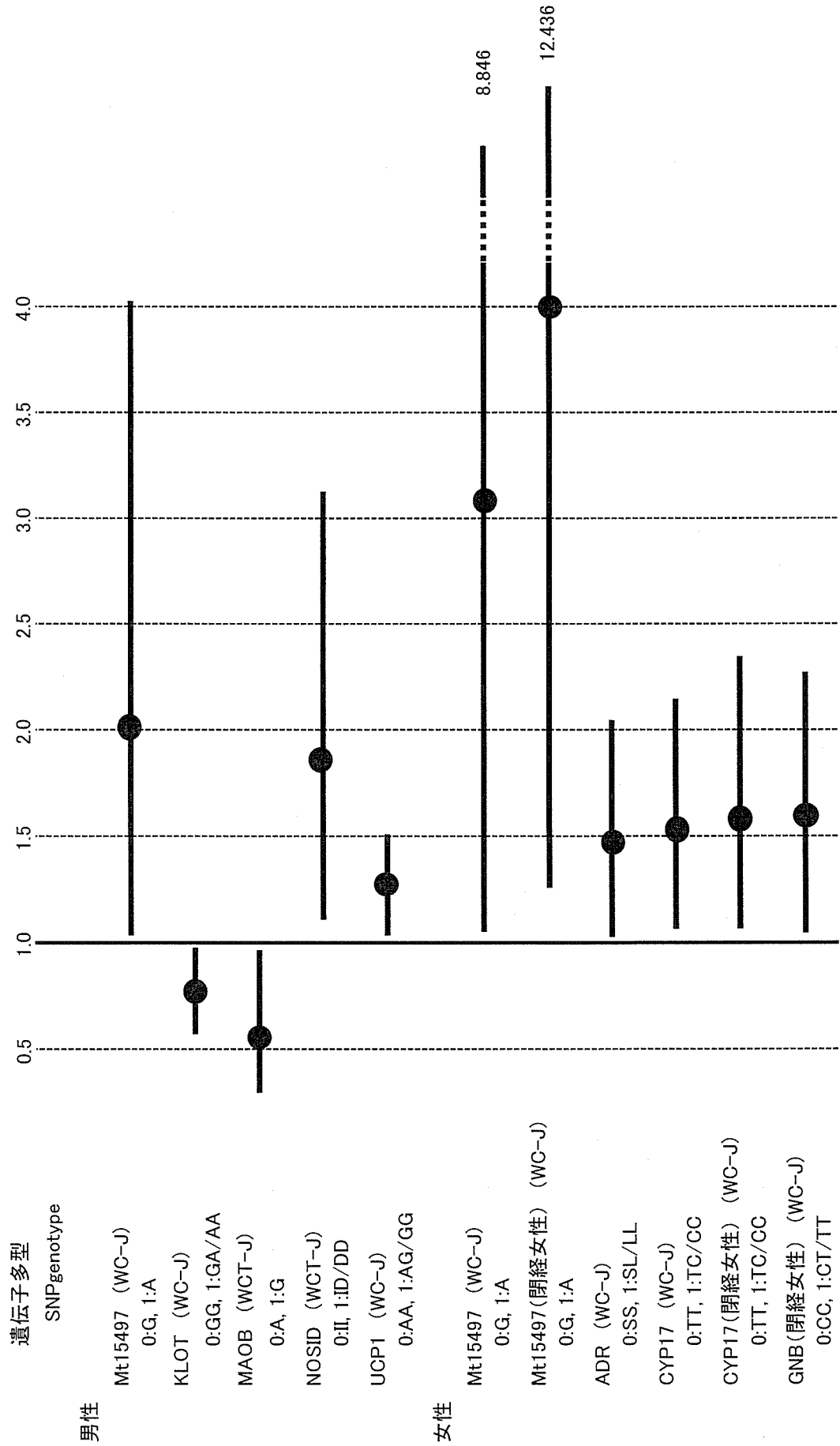


表4 内臓肥満に特異的な遺伝子多型

(腹腔内脂肪面積もしくはウエスト囲を従属変数、遺伝子多型を説明変数、年齢・BMIを調整変数とした一般化線形モデルによる分析)

遺伝子多型	性	閉経の有無	従属変数		年齢を調整した一般化線形モデルによる遺伝子多型間の有意差 (p value)
			腹腔内脂肪面積 (waistct)/	ウエスト囲(wcm)	
ABCA	女性		waistct		0.050 *
ABCA	女性	未閉経	waistct		0.010 **
AGTR5	女性	未閉経	waistct		0.019 *
ANP2	男性		wcm		0.025 *
ANP2	男性		waistct		0.035 *
APOE4	女性		wcm		0.026 *
APOE4	女性		waistct		0.022 *
APOE4	女性	閉経	wcm		0.021 *
APOE4	女性	閉経	waistct		0.025 *
B3ADR	男性		waistct		0.028 *
BMP4	男性		wcm		0.001 ***
BMP4	女性		waistct		0.015 *
BMP4	女性	閉経	waistct		0.042 *
BMP4	女性	未閉経	waistct		0.049 *
CCR	女性		wcm		0.034 *
CP10	女性	閉経	waistct		0.022 *
EDN1	女性		wcm		0.044 *
ESR1	女性		waistct		0.035 *
FABP2	女性	閉経	wcm		0.049 *
G1A3	女性	未閉経	wcm		0.014 *
GNRH1	女性	閉経	waistct		0.008 **
GNRH1	女性	未閉経	waistct		0.017 *
GS	女性	未閉経	waistct		0.048 *
IL1A	男性		waistct		0.034 *
IL6	女性	未閉経	wcm		0.034 *
IRAK1	男性		wcm		0.005 **
IRAK1	男性		waistct		0.003 **
IRS1	女性	閉経	wcm		0.018 *
LMNA	女性		waistct		0.040 *
MMP12	女性	未閉経	wcm		0.040 *
Mt15497	男性		wcm		0.029 *
MTH	女性	未閉経	waistct		0.049 *
NAD	女性		wcm		0.007 **
NAD	女性	閉経	wcm		0.032 *
NAD	女性	閉経	waistct		0.020 *
NOS1D	男性		waistct		0.003 **
NOS3	女性	未閉経	waistct		0.043 *
OPG2	女性	閉経	wcm		0.041 *
OST	女性	未閉経	waistct		0.030 *
PAR	女性	未閉経	waistct		0.015 *
PONA1	女性		waistct		0.044 *
PONA1	女性	閉経	waistct		0.040 *
PRC	女性		wcm		0.012 *
PRC	女性	閉経	wcm		0.034 *
S1BR	女性	閉経	waistct		0.016 *
SHIP2	女性	未閉経	waistct		0.027 *
TGF1	女性		wcm		0.001 ***
TGF1	女性		waistct		0.029 *
TGF1	女性	閉経	wcm		0.000 ***
TGF1	女性	閉経	waistct		0.021 *

(表4 続き)

TGF2	女性		wcm	0.019	*
TGF2	女性		waistct	0.031	*
TGF2	女性	閉経	wcm	0.012	*
TGF2	女性	閉経	waistct	0.005	**
TNF	男性		waistct	0.015	*
TOM40	女性		wcm	0.032	*
TOM40	女性	閉経	wcm	0.027	*
UCP1	女性	閉経	wcm	0.042	*
UCP2	男性		wcm	0.036	*

*;p<0.05, **;p<0.01, ***;p<0.001

表5 性別、閉経の有無別のロジスティック解析(年齢、BMI調整)

遺伝子多型	SNP genotype	性、閉経の有無	内臓肥満判定法	Odds比	95%CI	p value
ABCA	0:aa, 1:ag/gg	男性	ウエスト周囲径	0.750	0.562 - 1.000	0.050
APOE4	0:xx, 1:x4/44	女性	ウエスト周囲径	0.259	0.077 - 0.873	0.029
APOE4	0:xx, 1:x4/44	閉経女性	ウエスト周囲径	0.216	0.053 - 0.878	0.032
BMP4	0:TT, 1:TC/CC	男性	ウエスト周囲径	1.650	1.158 - 2.351	0.006
BMP4	0:TT, 1:TC/CC	女性	ウエスト周囲径	0.441	0.216 - 0.902	0.025
CCR	0:GG, 1:GA/AA	女性	ウエスト周囲径	2.077	1.218 - 3.544	0.007
CCR	0:GG, 1:GA/AA	閉経女性	ウエスト周囲径	2.156	1.217 - 3.821	0.009
IL6	0:CC, 1:CG/GG	男性	ウエスト周囲径	0.520	0.280 - 0.963	0.038
IRAK1	0TT, 1:TC/CC	男性	内臓脂肪面積	1.661	1.084 - 2.545	0.020
IRS1	0:GG, 1:GA/AA	閉経女性	内臓脂肪面積	9.502	1.898 - 47.559	0.006
Mt15497	0:G, 1:A	女性	内臓脂肪面積	0.024	0.002 - 0.307	0.004
Mt15497	0:G, 1:A	閉経女性	内臓脂肪面積	0.012	<0.001 - 0.190	0.002
NAD	0:CC, 1:CT/TT	男性	内臓脂肪面積	0.243	0.077 - 0.767	0.016
NAD	0:CC, 1:CT/TT	女性	ウエスト周囲径	0.174	0.053 - 0.572	0.004
NAD	0:CC, 1:CT/TT	閉経女性	ウエスト周囲径	0.176	0.046 - 0.674	0.011
TGF2	0:CC, 1:CT/TT	女性	ウエスト周囲径	1.795	1.094 - 2.945	0.021
TGF2	0:CC, 1:CT/TT	閉経女性	ウエスト周囲径	1.855	1.078 - 3.194	0.026

ABCA;ATP-binding cassette,sub-family A (rs2230806)

APOE4;Apoprotein E (E2/E/E4), xは2もしくは3

BMP4;bone morphogenetic protein 4 (C6007T) (rs17563)

CCR;Chemokine receptor 2 (G190A (Val64Ile)) (rs1799864)

IL6;interleukin-6(C-634G) (rs1800796)

IRAK1;Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (T587C(F196S)) (rs1059702)

IRS1;Insulin receptor substrate-1(G3494A(Gly972Arg)) (rs1801278)

Mt15497;MT15497 (G/A), ミトコンドリア遺伝子

NAD;NADH/NADPH p22phox(242C/T(His/Try)) (rs4673)

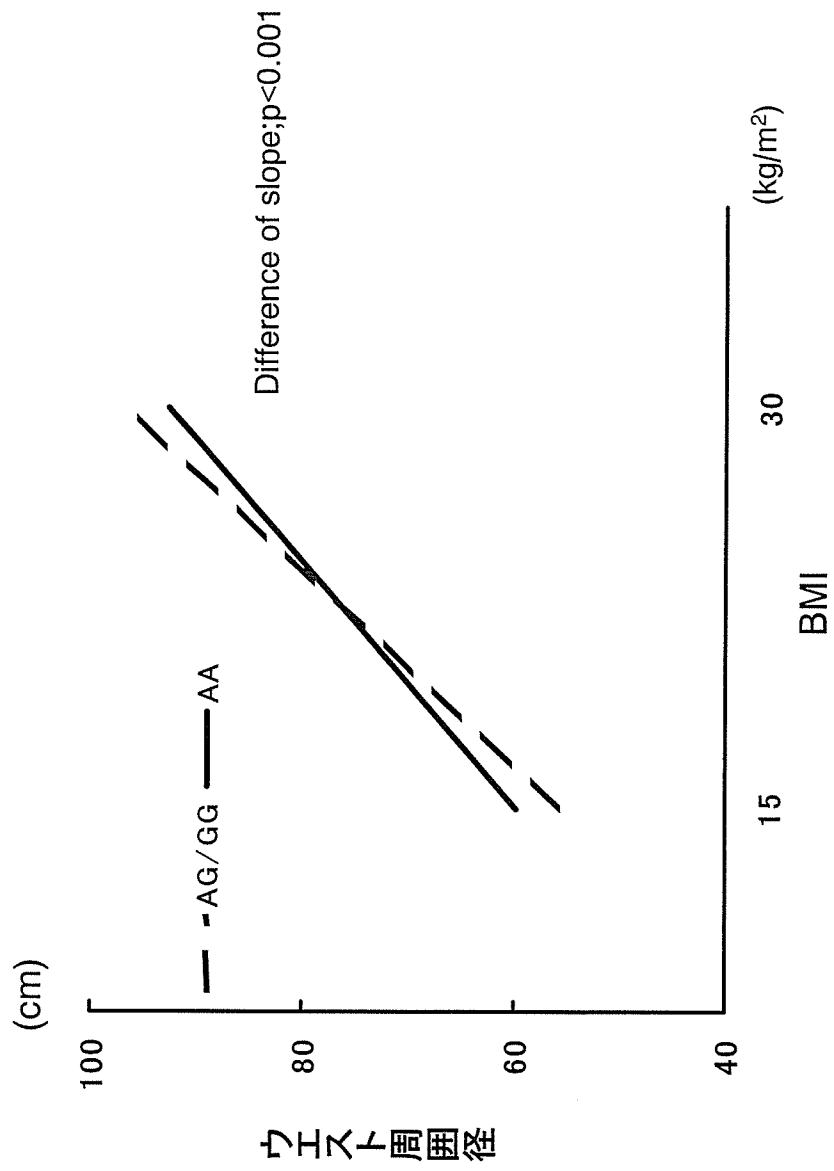
TGF2;Transforming growth factor-β 1 (C-509T) (rs1800469)

表6 内臓脂肪面積、ウエスト周囲径に対してBMIとの交互作用を示す遺伝子多型

	内臓脂肪面積				ウエスト囲			
	男性	女性	未閉経	閉経	男性	女性	未閉経	閉経
ABCA		**		***				**
ADD1			*					
ADH				*				
AGN	*		*			*		
APM1			*	*	*			
CCR		*		*				
CHRM2		*						
COMT			**					
DAT							*	
DLST1			*					
ESR2					*			
ESRA3			**				*	
GNB			*					
IGF2R							*	
IGF2R2			***				**	
IL4R	*							
IRAK1						*		
IRS1	*						*	
LMNA					*			
MAOB	*				**			
Mt12811		*			*	**		*
Mt15497				*		***		***
MTH	*							
NAD		**		*				
NOS3		*		*				
OPG1							*	
OPG2	*				*			
PAI		**		*				
PONA2	*							
RAGE1				*			*	
RAGE2								*
S2AR	*							
SCNN1G		*						
TGF1		*				**	**	
VDR1					*			

*;p<0.05, **;p<0.01, ***;p<0.001

図3 ABCA遺伝子多型とBMIとのウエスト周囲径に対する交互作用



ABCA遺伝子多型のAAではBMIが1 kg/m²上昇するとウエスト周囲径が2.2cm上昇するが、AG/GGでは2.7cm上昇する。

新しい動物モデルを用いる内臓肥満および動脈硬化発症メカニズムの解明

分担研究者 山下 均 中部大学生命健康科学部 生命医科学科 教授

研究要旨 褐色脂肪組織に存在するミトコンドリア脱共役蛋白質（UCP1）を欠損するマウスは高脂肪食の摂取によりインスリン抵抗性を伴う内臓肥満を発症する新しいモデルマウスである。このマウスを用いて内臓肥満と動脈硬化につながる病態の解析を進めた結果、肥満マウスにおいて脂肪酸代謝に関与する遺伝子の有意な変化が認められた。中でも、心筋や骨格筋細胞内における脂肪酸輸送にはたらく脂肪酸結合蛋白質3（FABP3）が褐色脂肪組織において異所性に誘導されることを見出した。そこで、FABP3の発現についてさらに検討を加えた結果、FABP3のmRNAと蛋白レベルが共に肥満マウスの骨格筋において著明に上昇していることが明らかとなった。種々のパラメーターとの関連をさらに詳細に検討したところ、骨格筋におけるFABP3の発現が体重や内臓脂肪量の増加、心肥大、血清インスリン値の上昇などと高い正の相関を示すことが判明した。また、培養細胞を用いた発現解析において、FABP3の発現により脂肪酸の細胞内への取込みが上昇することが確認された。以上の結果は、骨格筋におけるFABP3の役割がUCP1欠損マウスにおける内臓肥満とそれに付随する病態進行に深く係ることを示唆する。FABP3発現レベルの上昇は、内臓脂肪の蓄積を抑制し過剰の脂肪酸を筋肉に送り消費を促進する代償的な反応であるかもしれない。骨格筋における脂肪酸代謝と動脈硬化発症との関連についてさらなる検討が必要と思われる。

A. 研究目的

加齢に伴うエネルギー代謝及び熱産生機能の低下は、肥満や耐寒性の低下と関連し、中高年者の健康にとって重大な問題である。特に、内臓肥満はメタボリックシンドロームの主因となり、動脈硬化の発症に深く係ることが明らかとなってきた。我々は現在までに、非ふるえ熱産生の主要組織として知られる褐色脂肪組織に存在するミトコンドリア脱共役蛋白質（Uncoupling protein 1, UCP1）の役割に注目し、熱産生機能とエネルギー代謝との関連から研究を進めてきた。この褐色脂肪組織はヒトでは生後急速に消退し、一般に成人ではUCP1をほとんど検出することができないことから、UCP1

を欠損する（UCP1-KO）マウスを作製しエネルギー代謝における表現型を解析した結果、UCP1-KO マウスは高脂肪食の摂取によりインスリン抵抗性を伴う内臓肥満を発症することを見出した。本研究は、この知見に基づき、ヒト内臓肥満の新しいモデルマウスとなるUCP1-KO マウスを利用して内臓肥満から動脈硬化が進展するメカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、脂質代謝に係る分子群の動態に注目し、内臓肥満発症や動脈硬化の進展に果たす役割などについて分子生物学、分子遺伝学、細胞生物学的手法を用いて、個体、細胞、分子レベルで明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

(1) 遺伝子改変マウスを用いる動物実験

動物個体の表現型は、その個体の遺伝的背景と環境要因により大きく影響を受けることから、安定した飼育環境と遺伝的背景の均一（コンジェニック）な実験動物の利用が重要である。我々は、コンジェニックな *UCP1-KO* マウス（*C57BL/6J background*）を作製し、本研究に使用した。*Wild-type* マウスと *UCP1-KO* マウス（*N12-N14*）を生後3ヶ月間標準食（*CE-2*, 日本クレア）で飼育した後、高脂肪食（*CE-2+粉末牛脂20%*）で飼育を継続し、様々な月齢にて白色脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓、心臓、骨格筋などの組織の採取を行った。また、血液を採取し血清中のレプチンとインスリンレベルを市販のELISAキットを用いて測定した。

(2) 脂質代謝関連遺伝子の解析

採取した組織から Total RNA を回収し、ノーザンブロット法によりレプチン、*UCP2*、*UCP3*、ホルモン感受性リパーゼ（Hormone sensitive lipase, *HSL*）、アセチル-CoA カルボキシラーゼ（Acetyl-CoA carboxylase, *ACC*）、脂肪酸合成酵素（Fatty acid synthase, *FAS*）、脂肪酸結合蛋白質3および4（Fatty acid binding protein, *FABP3*, *FABP4/aP2*）などの mRNA 発現量を測定した。

(3) *FABP3* 蛋白レベルの解析

褐色脂肪組織と骨格筋から組織抽出液を調製し、ウエスタンブロット法により *FABP3* 蛋白の検出を行い、発現レベルを調べた。*FABP3* に対する抗体は、大腸菌を用いて作製した組換え *FABP3* をウサギに免疫して得られた血清から精製し用いた。

(4) 培養細胞による脂肪酸取込み実験

FABP3 の cDNA を組込んだ *pIRES2-GFP* 発現ベクターを構築し、このプラスミドを用いて *Cos7* 細胞に *FABP3* 遺伝子を導入した。48時間後、細胞培養液に ^{14}C -パルミチン酸を加え、30分後、120分後に細胞を回収して取込まれた ^{14}C

の放射量を測定した。ベクターのみを遺伝子導入した細胞を対照として、*FABP3* 蛋白の発現が脂肪酸取込みに及ぼす影響を比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、中部大学実験動物教育研究センターに設置される実験動物委員会の承認を得、動物使用の倫理規定に従って実験を行った。

C. 研究結果

(1) *Wild-type* マウスに比べて、*UCP1-KO* マウスは加齢と共に脂肪肝や心肥大を伴うより強度の内臓肥満を発症した。相関解析から、生殖器周囲や後腹膜の脂肪組織量、肝臓重量、心臓重量などと体重増加が極めて高い相関を示した。血清レプチンとインスリンレベルは肥満マウスで高い傾向が認められた。

(2) 脂質代謝に係わる遺伝子の発現を調べた結果、肥満した *UCP1-KO* マウスの褐色脂肪組織と白色脂肪組織においてレプチンと *UCP2* mRNA レベルの著明な上昇が認められた。また、*FABP4* mRNA レベルの有意な上昇に加えて、本来筋肉で発現する *FABP3* が異所性に誘導されていることが見出された。心臓および腓腹筋における *FABP3* mRNA レベルについても調べた結果、どちらの組織においても肥満マウスで *FABP3* mRNA レベルが上昇している傾向が認められたが、腓腹筋 *FABP3* mRNA レベルが *Wild-type* マウスばかりでなく *UCP1-KO* マウスにおいても体重増加と強く相関していることが明らかとなった。脂肪組織における *FABP4* mRNA レベルの体重増加との相関は *Wild-type* マウスでみられたが、*FABP3* に比べて小さかった。一方、中性脂肪を分解し脂肪酸を遊離する *HSL* や *de novo* の脂肪酸合成に関与する *ACC* と *FAS* の mRNA レベルは大きく低下した。

(3) 遺伝子発現レベルの検討をもとに、*FABP3* 蛋白レベルの解析を進めた結果、肥満マウス由

来の褐色脂肪組織と腓腹筋において FABP3 蛋白レベルの著明な上昇が検出された。体重などの種々のパラメーターとの相関を解析した結果、腓腹筋における FABP3 蛋白レベルが肥満病態の進行とよく相関していることが見出された。すなわち、腓腹筋 FABP3 蛋白レベルは体重、内臓脂肪、心肥大、血清インスリン値などと高い相関を示すことが明らかとなった。

(4) FABP3 の脂肪酸取込みにおける役割を *in vitro* の細胞発現系を用いて検討した。その結果、FABP3 を発現した培養 Cos7 細胞において ¹⁴C-パルミチン酸の取込みが 120 分後では FABP3 非発現細胞に比べて約 1.5 倍に増加することが明らかとなり、FABP3 の発現上昇が脂肪酸取込みを促進することを確認した。

D. 考察

内臓肥満の発症において脂質代謝は極めて重要である。摂取された脂質は、脂肪酸として組織で利用され代謝されるが、過剰の遊離脂肪酸はインスリン抵抗性などを惹起することから、速やかに脂肪組織に吸収され、中性脂肪に再合成されて蓄えられる。この過度の中性脂肪の蓄積により内臓肥満が進行する。内臓肥満が進行すると、余剰の遊離脂肪酸をマクロファージが取込み排除することになるが、脂肪酸や酸化 LDL を取込んだマクロファージは泡沫化し、動脈硬化の進展へとつながるとされる。現在までに、このマクロファージや脂肪組織で発現される脂肪酸結合蛋白質 (FABP4/aP2) の役割が明らかとなり動脈硬化との関連が報告されている。FABP3 については、急性心筋梗塞や脳卒中の際に血中レベルが急激に上昇することが知られ、それらの確定診断や血中レベルと予後の病態との関係が報告されているが、肥満や動脈硬化との関連についてはほとんど知られていない。面白いことに、本研究の肥満モデルマウスにおいては、脂肪組織における FABP4 の遺伝子発現よりも、骨格筋における FABP3 の発現の

方が内臓肥満の進展やそれに付随する病態とより強く相関していることが示唆された。蛋白質の発現量においても内臓脂肪量の増加と相関して骨格筋の FABP3 レベルが上昇した結果は、内臓脂肪の蓄積を抑制し過剰の脂肪酸を筋肉に送り消費を促進する代償的な反応である可能性を示唆するが、骨格筋におけるエネルギー代謝やインスリン抵抗性との関連について、さらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

新しいヒト内臓肥満のモデルマウスを用いた解析から、内臓肥満の進展と共に発現量の上昇する分子として FABP3 を見出した。FABP3 は細胞内における脂肪酸輸送に係る分子であるが、その発現上昇により遊離脂肪酸の細胞内への取込みが増加する。動脈硬化進展との関連を含めて、内臓肥満の発症と FABP3 の役割の解明に興味を持たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wang, Y., Kimura, K., Inokuma, K., Saito, M., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Mori, M., and Yamashita, H. (2006) Potential contribution of vasoconstriction to suppression of heat loss and homeothermic regulation in UCP1-deficient mice. *Pflüger Arch. Eur. J. Physiol.*, 452: 363-369.

2) Inokuma, K., Okamatsu-Ogura, Y., Omachi, A., Matsushita, Y., Kimura, K., Yamashita, H., Saito, M. (2006) Indispensable role of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) for anti-obesity effect of β 3-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol.*, 290: E1014-E1021.

3) 山下 均: 脂肪組織の代謝-7. ミトコンドリア: UCP1, PGC1 ファミリーなど. In: 糖尿病カレントライブラリー⑦「脂肪細胞と脂肪組織」,

文光堂, 東京, 2007, in press.

2. 学会発表

1) 山下 均: 「加齢、食事による温熱制御シグナルの変化と肥満の進展」第76回日本衛生学会シンポジウム(化学物質をはじめとする環境有害物質がシグナル伝達分子の機能修飾を介して疾患を誘発する機構)、2006年3月28日、宇部。

2) Kontani, Y., Wang, Y., Mori, N., and Yamashita, H.: The roles of UCP in thermoregulation and aging. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB Congress, Jun. 2006, Kyoto.

3) 山下 均: 「エボジアミンの抗肥満作用と健康長寿」第26回日本基礎老化学会シンポジウム(食品による寿命制御の分子機構)、2006年11月11日、名古屋。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

「メタボリックシンドロームの予知検査方法」

(仮題) 申請準備中。

Ⅲ. 研究成果の刊行に 関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻数	ページ	出版年
Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H	Effect of smoking habit on age-related changes in serum lipids: cross-sectional and longitudinal analysis in a Japanese large cohort.	Atherosclerosis	185(1)	183-199	2006
下方浩史	老化および老年病の疫学的研究	Geriatric Medicine	45(1)	13-17	2007
Imai T, Nakamura M, Ando F, Shimokata H	Dietary supplement use by community-living population in Japan: Data from the National Institute for Longevity Sciences Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA).	J Epidemiol	16(6)	249-260	2006
下方浩史	高齢者の生活習慣はどこまで是正すべきか	日本老年医学会雑誌	43(4)	462-464	2006
Suzuki Y, Ando F, Ohsawa I, Shimokata H, Ohta S	Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese	J Hum Genet	51(1)	31-37	2006
Ishida S, Funakoshi A, Miyasaka K, Shimokata H, Ando F, Takiguchi S	Association of SH-2 containing inositol 5'-phosphatase 2 gene polymorphisms and hyperglycemia	Pancreas	33(1)	63-67	2006
Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H	Preproghrelin Leu72Met variant contributes to overweight in middle-aged men of a Japanese large cohort.	Int J Obes	30(11)	1609-1614	2006
Wang, Y., Kimura, K., Inokuma, K., Saito, M., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Mori, M., and Yamashita, H.	Potential contribution of vasoconstriction to suppression of heat loss and homeothermic regulation in UCP1-deficient mice.	Pfluger Arch.-Eur. J. Physiol	452	363-369	2006
Inokuma, K., Okamatsu-Ogura, Y., Omachi, A., Matsushita, Y., Kimura, K., Yamashita, H., Saito, M.	Indispensable role of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) for anti-obesity effect of β 3-adrenergic stimulation.	Am. J. Physiol.	290	E1014-E1021	2006
Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H	Age-specific change of prevalence of metabolic syndrome: Longitudinal observation of large Japanese cohort.	Atherosclerosis			印刷中
下方浩史、安藤富士子、北村伊都子、甲田道子、大藏倫博	加齢とメタボリックシンドローム一年齢別にみたメタボリックシンドロームのウエスト基準値の妥当性ー	日本未病システム学会雑誌			印刷中
安藤富士子、北村伊都子、甲田道子、大藏倫博、下方浩史	一般地域住民における腹部肥満感受性因子の網羅的検討	日本未病システム学会雑誌			印刷中

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻数	ページ	出版年
Yamada Y, Ando F, Shimokata H	Association of gene polymorphisms with blood pressure and the prevalence of hypertension in community-dwelling Japanese individuals	Int J Mol Med			印刷中
下方浩史:	食生活と長寿	日本老年医学雑誌			印刷中
Kitamura I, Ando F, Koda M, Okura T, Shimokata H	Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor α gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese	Bone			印刷中
下方浩史	食生活と長寿	日本老年医学雑誌			印刷中