



Induction of fatty acid-binding protein 3 in brown adipose tissue correlates with increased demand for adaptive thermogenesis in rodents

Hitoshi Yamashita^{a,*}, Zuo Cheng Wang^b, Youxue Wang^c, Masahiko Segawa^d,
Tatsuya Kusudo^a, Yasuhide Kontani^e

^a Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai 487-8501, Japan

^b Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alta., Canada T6G 2H7

^c Department of Surgery, UT Southwestern Medical Center at Dallas, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75390, USA

^d Department of Preventive Medicine and Public Health, National Defense Medical College, Tokorozawa 359-8513, Japan

^e Department of Food Science for Health, Minami-Kyushu University, Miyazaki 880-0032, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2008

Available online 18 October 2008

Keywords:

Adaptive thermogenesis

Brown adipose tissue

Fatty acid-binding protein 3

Uncoupling protein 1

Gene expression

Knockout mouse

ABSTRACT

We investigated the contribution of fatty acid-binding protein 3 (FABP3) to adaptive thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) in rodents. The expression of FABP3 mRNA in BAT was regulated discriminatively in response to alteration of the ambient temperature, which regulation was similar and reciprocal to the regulation of uncoupling protein 1 (UCP1) and leptin, respectively. FABP3 expression in the BAT was significantly higher in the UCP1-knockout (KO) mice than in the wild-type ones, and these KO mice showed a higher clearance rate of free fatty acid from the plasma. In addition, FABP3 expression in the BAT was increased greatly with the development of diet-induced obesity in mice. These results indicate that the induction of FABP3 in BAT correlates with an increased demand for adaptive thermogenesis in rodents. FABP3 appears to be essential for accelerating fatty acid flux and its oxidation through UCP1 activity for non-shivering thermogenesis in BAT.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Brown adipose tissue (BAT) is the most important organ for adaptive thermogenesis, which is a response to environmental alterations such as cold (cold-induced thermogenesis) and excessive food intake (diet-induced thermogenesis) in order to maintain body temperature and energy homeostasis, respectively, in mammals [1–3]. Uncoupling protein 1 (UCP1), which is located exclusively in the inner mitochondrial membrane of BAT, is a unique thermogenic protein and its expression level is increased by cold exposure in rodents [4]. UCP1 functions to dissipate chemical energy produced by oxidative phosphorylation of energy fuels such as fatty acid (FA) and glucose, resulting in heat generation. The important roles of UCP1 in body temperature regulation in cold and in energy metabolism have been demonstrated in previous studies using UCP1-knockout (KO) mice [5–8].

Fatty acid-binding proteins (FABPs) are small cytosolic proteins that are members of the superfamily of lipid-binding proteins [9,10]. FABPs are expressed in a variety of cells, and nine molecules with different tissue distribution patterns are presently known. FABP4/aP2 is expressed mainly in adipocytes while FABP3, also called H-FABP, is most abundant in heart and skeletal muscles [11,12]. FABPs have been postulated to be translocators of long-chain FAs to intracellular organelles such as mitochondria

and nucleus [9]. It has been suggested that FABP3 is specifically involved in FA oxidation in energy metabolism in heart and skeletal muscles [12,15–17]. Actually, genetic lack of FABP3 severely impairs FA uptake and oxidation [15]. We have reported that a 12.5-kD protein was markedly induced in BAT of cold-acclimated rats [13]; and this cold-inducible protein was clarified later to be FABP3 [14]. However, the contribution of FABP3 expressed in BAT to adaptive thermogenesis still remains to be understood.

In the present study, we examined the regulation of FABP3 expression in BAT under three different thermal conditions in rats. In addition to the contribution of FABP3 to FA utilization, we also investigated the induction of FABP3 in the BAT of UCP1-KO mice, which showed cold sensitivity and increased susceptibility to diet-induced obesity with age.

Materials and methods

Animals. Experiment-1: Male Wistar strain rats were obtained from Japan SLC at 7 weeks of age. The rats were housed individually under barrier conditions and reared at 23 °C under artificial lighting for 12 h and provided standard chow (CR-1, CLEA JAPAN, INC.) and tap water *ad libitum*. At 8 weeks of age, the rats (243 ± 7 g, n = 15) were divided into three groups and maintained either at 5, 23 or 32 °C for 2 weeks. After the rats had been killed by decapitation, their interscapular BAT was dissected and used for RNA

* Corresponding author. Fax: +81 568 51 6017.
E-mail address: hyamashi@isc.chubu.ac.jp (H. Yamashita).

preparation. Experiment-2: UCP1-KO (C57BL/6J background, N12-N15 generations) and wild-type (WT) mice were bred and reared at 23 °C under artificial lighting for 12 h per day, and provided a different standard chow (CE-2, Clea Japan, Inc.) and tap water *ad libitum*. A number of mice were fed a high-fat diet (HF: B15040, Clea Japan, Inc.) from the age of 3 months, as described previously [7]. The KO and WT mice were sampled at various ages. The experiments in the present study were performed according to our institutional guidelines for animal care.

Preparation of FABP3-expressing cells and culture. Rat FABP3 cDNA containing the open reading frame was generated as described previously [18] and inserted into a pIRES2 vector (Clontech, CA). Cos7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) containing 10% fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences, Lenexa, IA, USA) at 37 °C in 5% CO₂. The cells were transfected with the pIRES2-FABP3 vector by using Lipofectamine (Invitrogen) and were used to determine free fatty acid (FFA) uptake after 48 h of transfection.

RNA analysis. Total RNA (15 µg), prepared from the BAT with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), was analyzed by Northern blotting as described previously [7]. Blots were hybridized successively with probes (labeled with [³²P]dCTP) for the mRNAs of UCP1, leptin, FABP3, FABP4, β-actin, and/or 18S rRNA. These probes were produced by the reverse transcription PCR technique as previously described [7,19]. Hybridization signals were quantified with Fuji Bioimage.

Protein analysis. Western blot analyses for FABP3 and β-tubulin were performed by using the cytosolic fraction or whole cell lysates recovered from BAT or cultured cells and specific antibodies, as described previously [18]. The protein concentration in the samples was measured by conducting BCA protein assays (PIERCE, Rockford, IL). Equal amounts of protein (20 µg) were separated on 12.5% gels (Daiichi Pure Chemicals; Tokyo, Japan) and transferred onto immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). The membranes were incubated with the specific antibodies for rat FABP3 [18] or β-tubulin (Santa Cruz, CA). After the secondary antibody reaction for 1 h at room temperature, the specific signals were detected by using an ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The resulting images were quantified with NIH Image (version 1.63).

Fat-loading and FA uptake tests. For the fat-loading test, 6-month-old mice fasted for 17 h were injected with 30 ml of 20% Intralipid (Research Biochemicals International) through a tail vein to generate a sudden rise in their plasma FFA [20]. Blood samples were collected from the tail vein before and 3, 15, 30, and 60 min after the Intralipid injection. FFA levels in the serum were measured by using a commercial assay kit (NEFA C-test, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan). FA uptake in cells was determined according to the method of Darimont et al. with minor modification [21]. Cos7 cells transfected with the pIRES2-FABP3 vector were washed with warm PBS and subsequently incubated with a serum-free DMEM supplemented with 0.1% BSA (fatty acid-free, Sigma) for 24 h. [¹⁴C]-Palmitate/sodium taurocholate micelles were prepared by mixing 50 µM palmitate and 5 µM [¹⁴C]-palmitate (55 Ci/mol; PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) with serum-free DMEM supplemented with 8 mM sodium taurocholate (Fluck). This solution was equilibrated for 30 min at 37 °C and added to the culture. After incubation for 30 or 120 min, the medium was removed; and the cells were then washed twice with 0.5 ml of ice-cold PBS. Thereafter they were lysed in 250 µl of 1% sodium dodecyl sulfate. The lysate (100 µl) was diluted in 2 ml of scintillation fluid, and its radioactivity was quantified. The final amount of uptake was expressed as pmol per 10⁵ cells.

Statistical analysis. Data were expressed as means ± SE. Significant differences among groups were assessed by analysis of variance (ANOVA) with Fisher's PLSD test.

Results and discussion

Ambient temperature profoundly affects energy metabolism and body temperature regulation. In rodents, BAT is the most important organ to produce heat through the activity of UCP1 for homeothermic regulation [5,6,8]. UCP1 also plays a crucial role in diet-induced thermogenesis, in which excess caloric energy is dissipated as heat [1,2]. To confirm the role of BAT in thermoregulation, we maintained rats in a room at three different ambient temperatures, i.e., 5 °C (cold condition), 23 °C (standard condition), and 32 °C (thermoneutral condition), in the present study. Especially, the thermoneutral condition is essential to clearly determine the effects of ambient temperature in thermal physiology. After 2 weeks, the body weight increased in the cold and standard groups (28 ± 2 and 59 ± 3 g, respectively), whereas it was reduced in the thermoneutral group (−9 ± 7 g). Average food intake during the exposure was 33.1 ± 1.3, 28.4 ± 0.8, and 14.8 ± 1.0 g/day/rat in the cold, standard, and thermoneutral groups, respectively. We first examined the gene expression of UCP1 and leptin mRNAs in the BAT of rats (Fig. 1). As expected, the level of UCP1 mRNA significantly increased (290%) in the cold group and decreased (60%) in the thermoneutral group compared with that in the standard group. On the contrary, that of leptin mRNA was dramatically reduced and almost disappeared (~2% of the standard group) in the cold group, but it was increased (154%) in the thermoneutral group compared with that in the standard group, being in agreement with the levels of food intake in each group. This reciprocal regulation between UCP1 and leptin genes in BAT is consistent with the previous observation of Canello et al. [22]. Our data also support the functions of these genes under the thermal conditions. We then measured the level of FABP3 mRNA in the BAT of rats. Similar to the response of the UCP1 gene, this level discriminatively increased (810%) in the cold group and decreased (60%) in the thermoneutral group compared with that in the standard group, suggesting that FABP3 expression correlates with UCP1 function and the degree of heat requirement. Moreover, our data clearly illuminated the opposite regulation of gene expression between FABP3 and leptin in BAT. The mRNA level of FABP4, which is the major type of FABP in adipocytes, was also significantly higher (206%) in the BAT of the cold group, but a steady-state level was maintained in the thermoneutral group, compared with that in the standard group, suggesting a basal role of FABP4 in FFA utilization in the adipose tissue. A similar observation on the cold-induced expression of FABP3 mRNA in BAT was previously reported by Daikoku et al. [14]. Considering the primary function of FABP3, its marked increase in BAT would supply a large amount of long-chain FA for the mitochondria, where UCP1 efficiently "burns" the substrate to make heat in the cold condition.

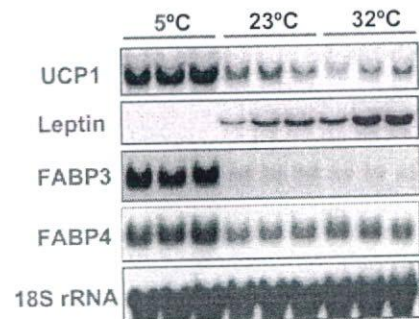


Fig. 1. Effect of ambient temperature on the expression of UCP1, leptin, FABP3 and FABP4 mRNAs in the BAT of rats. Northern blot analysis was conducted by using total RNA from the BAT of rats maintained at 5, 23, or 32 °C for 2 weeks. Hybridization signals were quantified and normalized by 18S rRNA level.

UCP1-KO mice are sensitive to cold and therefore heat demand to maintain body temperature appears to be high even under the standard thermal condition of $\sim 23^{\circ}\text{C}$ in animal facilities, as suggested by our previous studies [7,8]. In order to make sure the involvement of FABP3 in adaptive thermogenesis, we analyzed the expression level in BAT of UCP1-KO mice. As shown in Fig. 2A, at either 3 or 11 months of age and fed the standard chow diet, the UCP1-KO mice showed a significantly higher level (250–300%) of FABP3 mRNA in their BAT than the WT mice. The mRNA level of FABP3 in BAT was also significantly higher (218%) in the KO mice than in the WT ones at 3 months of age, whereas no difference between genotypes was detected at 11 months of age (data not shown), as described in previous study [7]. The increase in the

steady-state level of FABP3 mRNA in the BAT of UCP1-KO mice may reflect their requirement for thermogenesis, because the FABP3 mRNA level in their BAT was further increased after cold exposure (data not shown). Although the expression level was relatively low, an increased level of FABP3 mRNA was also detected in inguinal WAT of UCP1-KO mice compared with that of the WT mice (data not shown). The increase in FABP3 expression in the BAT of UCP1-KO mice was confirmed at the protein level. In mice fed the standard chow diet, significant increases in the FABP3 protein level (1.8-fold and 5.3-fold in 3-month-old and 11-month-old mice, respectively) were detected in BAT of UCP1-KO groups compared with those of WT groups (Fig. 2B). In addition, the protein level in the BAT was considerably higher in the older mice than in the younger ones in the KO group. Since UCP1-KO mice show increased susceptibility to diet-induced obesity with age [7], we also examined the effect of a HF diet on FABP3 expression in the BAT of mice. The FABP3 protein level in the BAT of WT mice fed the HF diet were increased markedly (4.4-fold) compared with that of control mice fed the standard chow at 11 months of age, and this higher level was retained in the BAT of older WT mice on the HF diet. In KO mice fed the HF diet, FABP3 protein level in their BAT was further increased compared with that of KO mice fed the standard

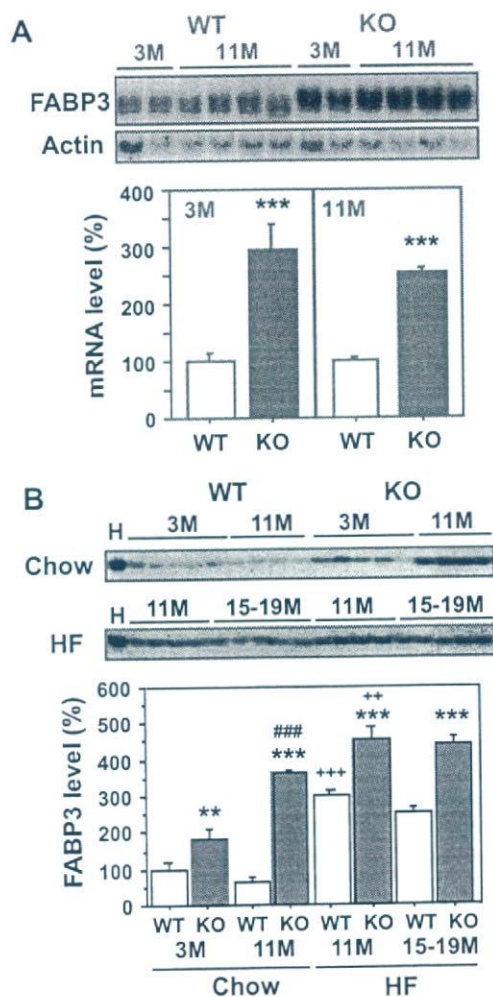


Fig. 2. Effects of age and diet on FABP3 expression in the BAT in WT and UCP1-KO mice. (A) Northern blot analysis was carried out by using total RNA from the BAT of 3- and 11-month-old mice fed a standard chow diet. Hybridization signals were quantified and normalized by β -actin mRNA level. Representative images are shown. The data (means \pm SE) are presented as a percentage of the levels in WT mice at each age. The numbers of mice were 10 (5 each for female and male) for each genotype of 3-month-old mice and 4 females for each genotype of 11-month-old mice. *** $P < 0.001$ vs. WT mice. (B) Western blot analysis for FABP3 was performed by using the cytosolic fraction (20 μg) from the BAT of mice fed the chow or HF diet. A fraction from heart (H, 1 μg) was used as a positive control. The data (means \pm SE) are presented as a percentage of the level in 3-month-old WT mice. The numbers of mice were 4–5 for each group. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. WT mice in the same age and diet groups. ### $P < 0.001$ vs. younger mice in the same genotype and diet groups. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. the mice with the chow diet in the same age and genotype groups.

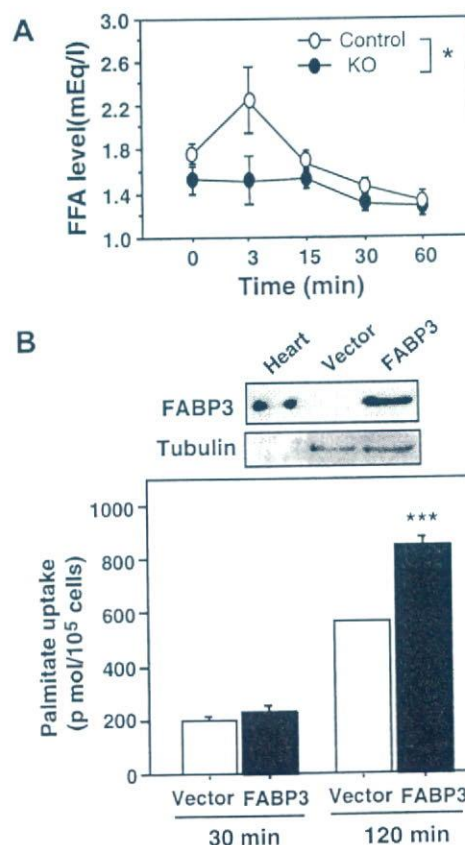


Fig. 3. FFA uptake in UCP1-KO mice and in cultured cells expressing recombinant FABP3. (A) Fat-loading test. Two groups of mice were injected with Intralipid via a tail vein after a 17-h fast. FFA levels in the serum at the indicated time points were measured. Data are expressed as means \pm SE ($n = 6$ for each group). * $P < 0.05$ (repeated measure ANOVA). (B) Cos7 cells were transfected with the pIRES2 vector bearing FABP3 cDNA (FABP3) or with the vector alone (Vector) and were cultured in a medium containing [^{14}C]-palmitate. Upper: Cell lysates (30 μg) were analyzed by Western blotting for FABP3 and β -tubulin. The cytosolic fraction of heart (1 μg) was used as a positive control. Lower: The radioactivity in the cells was determined after 30 and 120 min and expressed as pmol per 10^5 cells. Data are expressed as means \pm SE ($n = 3$ for each group). *** $P < 0.001$ vs. the corresponding vector control.

chow at 11 months of age; and this higher level was retained in the BAT of older KO mice. We also found a positive correlation between the level of FABP3 mRNA in the BAT and BW in the mice in a regression analysis, whereas there was no relation between the level of FABP4 mRNA in the BAT and BW (data not shown). These results strongly suggest that FABP3 expression in the BAT increases with the development of diet-induced obesity in mice.

Since the steady-state levels of FABP3 protein were elevated considerably in the BAT of UCP1-KO mice compared with those of the WT mice, we analyzed the ability for FFA uptake in these mice. In the fat-loading test, the serum FFA level increased in 3 min after the lipid injection and then decreased with time in the control group (Fig. 3A). On the other hand, the increase in the FFA level observed at 3 min in the control mice was blunted in the UCP1-KO mice, indicating accelerated FFA clearance from the plasma in the mutant mice. In an *in vitro* analysis to see the effect of FABP3 induction on FFA uptake, we transfected Cos7 cells with a FABP3 expression vector and incubated them in medium containing [¹⁴C]-palmitate. There was no difference in palmitate uptake at 30 min between the vector and FABP3 groups, whereas a significant increase in the FFA uptake was detected at 120 min in Cos7 cells expressing FABP3 compared with the cells transfected with the vector alone (Fig. 3B), indicating the potential of this protein for stimulating FFA uptake. Taken together, our data indicate that it is likely that the augmented FABP3 level in BAT (and probably WAT in a lesser extent) increases FFA flux into the tissue from the bloodstream and stimulates UCP1 thermogenesis, which contributes to maintain body temperature in the cold condition or to dissipate excess energy in the HF diet condition in the WT mice. In UCP1-KO mice, however, FFA will not be utilized effectively without UCP1 in spite of FFA uptake strengthened by FABP3 induction, and the unmetabolized FFA is stored eventually as triacylglycerol in the tissue. Indeed, this scenario is supported by the fact that BAT hypertrophy is a typical characteristic of UCP1-KO mice [5,7]. The exhaustion seen after swimming training in FABP3-KO mice could be related partly to intolerance against the cold caused by evaporative heat loss [15], suggesting that the function of FABP3 is important for UCP1 thermogenesis in BAT.

Thus, our data clearly show that the induction of FABP3 in BAT correlates with an increased demand for adaptive thermogenesis in rodents. FABP3 appears to be essential for accelerating FFA flux and its oxidation through UCP1 activity for non-shivering thermogenesis in BAT. Further study is needed to understand the precise transcriptional regulation of FABP3 and the differences in the function between FABP3 and other FABPs such as FABP4.

Acknowledgments

The authors thank L.P. Kozak for providing the UCP1-KO mice, and Junjie Yao for technical assistance. This work was supported by grants (15C-8) from the program Research Grants for Longevity Sciences and from the program Health and Labor Sciences Research Grants, both of the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

- [1] L.P. Kozak, M.-E. Harper, Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure, *Annu. Rev. Nutr.* 20 (2000) 339–363.
- [2] B.B. Lowell, B.M. Spiegelman, Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis, *Nature* 404 (2000) 652–659.
- [3] B. Cannon, J. Nedergaard, Brown adipose tissue: function and physiological significance, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 277–359.
- [4] H. Yamashita, Y. Sato, N. Mori, Difference in induction of uncoupling protein genes in adipose tissues between young and old rats during cold exposure, *FEBS Lett.* 458 (1999) 157–161.
- [5] S. Enerback, A. Jacobsson, E.M. Simpson, C. Guerra, H. Yamashita, M.-E. Harper, L.P. Kozak, Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese, *Nature* 387 (1997) 90–94.
- [6] V. Golozoubova, E. Hohtola, A. Matthias, A. Jacobsson, B. Cannon, J. Nedergaard, Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold, *FASEB J.* 15 (2001) 2048–2050.
- [7] Y. Kontani, Y. Wang, K. Kimura, K.-I. Inokuma, M. Saito, T. Suzuki-Miura, Z. Wang, Y. Sato, N. Mori, H. Yamashita, UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age, *Aging Cell* 4 (2005) 147–155.
- [8] Y. Wang, K. Kimura, K. Inokuma, M. Saito, Y. Kontani, Y. Kobayashi, M. Mori, H. Yamashita, Potential contribution of vasoconstriction to suppression of heat loss and homeothermic regulation in UCP1-deficient mice, *Pflüger Arch. Eur. J. Physiol.* 452 (2006) 363–369.
- [9] J. Storch, A. Thumser, The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1486 (2000) 28–44.
- [10] A. Chmurzynska, The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism, *J. Appl. Genet.* 47 (2006) 39–48.
- [11] K.P. Claffey, V.L. Herrera, P. Brecher, N. Ruiz-Opazo, Cloning and tissue distribution of rat heart fatty acid binding protein mRNA: identical forms in heart and skeletal muscle, *Biochemistry* 26 (1987) 7900–7904.
- [12] J.F. Glatz, F.G. Schaap, B. Binas, A. Bonen, G.J. van der Vusse, J.J. Luiken, Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand.* 178 (2003) 367–371.
- [13] H. Yamashita, S. Gasa, M. Yamamoto, N. Sato, M. Segawa, D. Saito, M. Ishikawa, Y. Sato, H. Ohno, Are there proteins peculiar to cold acclimation?, in: G. Ueda (Ed.), *High Altitude Medicine*, Shinshu University Press, Matsumoto, 1992, pp. 502–506.
- [14] T. Daikoku, Y. Shinohara, A. Shima, N. Yamazaki, H. Terada, Dramatic enhancement of the specific expression of the heart-type fatty acid binding protein in rat brown adipose tissue by cold exposure, *FEBS Lett.* 410 (1997) 383–386.
- [15] B. Binas, H. Danneberg, J. McWhir, L. Mullins, A.J. Clark, Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization, *FASEB J.* 13 (1999) 805–812.
- [16] J. Shearer, P.T. Fueger, D.P. Bracy, D.H. Wasserman, J.N. Rottman, Partial gene deletion of heart-type fatty acid-binding protein limits the severity of dietary-induced insulin resistance, *Diabetes* 54 (2005) 3133–3139.
- [17] B. Binas, E. Erol, FABPs as determinants of myocellular and hepatic fuel metabolism, *Mol. Cell. Biochem.* 296 (2007) 59–67.
- [18] Z. Wang, Y. Kontani, Y. Sato, T. Mizuno, N. Mori, H. Yamashita, Muscle type difference in the regulation of UCP3 under cold conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 244–249.
- [19] Y. Kontani, Z. Wang, T. Furuyama, Y. Sato, N. Mori, H. Yamashita, Effects of aging and denervation on the expression of uncoupling proteins in slow- and fast-twitch muscles of rats, *J. Biochem.* 132 (2002) 309–315.
- [20] J. Fruebis, T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain, H.F. Lodish, Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 2005–2010.
- [21] C. Darimont, N. Gradoux, A. De Pover, Epidermal growth factor regulates fatty acid uptake and metabolism in Caco-2 cells, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) G606–G612.
- [22] R. Cencello, M.C. Zingaretti, R. Sarzani, D. Ricquier, S. Cinti, Leptin and UCP1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue, *Endocrinology* 139 (1998) 4747–4750.

脂肪細胞の役割からみる肥満 —新しい肥満予防法開発の試み—

Roles of adipocytes in the development of obesity

山下 均

Hitoshi YAMASHITA

要 旨

肥満は古くは富や健康（美）のシンボルであったが、現在では肥満状態が続くと健康に良くないことがわかってきた。最近問題となっているメタボリックシンドロームは、様々な生活習慣病につながることから全国的な予防への取り組みが本格的に始まりつつあるが、その第一が肥満の予防である。従来から、食べる量を制限する、あるいはエネルギーの消費を高めることにより肥満を予防する薬剤などの開発が行なわれてきたが未だ十分な効果を挙げるに至っていない。我々は、ヒトにおける肥満の成り立ちとその中心となる脂肪細胞の役割を理解し、真に効果のある肥満予防法の開発を試みてきた。本稿では、脂肪細胞の分化を阻害する植物成分を用いる新しい肥満予防法についての研究成果を含め、肥満における脂肪細胞の役割について概説する。

キーワード：メタボリックシンドローム、肥満、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、UCP1、
エボジアミン、シグナル伝達分子

1. メタボリックシンドロームと肥満

2008年4月から生活習慣病を予防するための国家プロジェクトとしてメタボリックシンドローム特定健康診査（通称、メタボ検診）がスタートする。メタボ検診では40-74歳の約5600万人が対象となり腹囲測定と血液検査を実施するもので、メタボリックシンドロームの増加がいかに深刻な社会問題となっているかがうかがわれる。内臓脂肪症候群とも呼ばれるメタボリックシンドロームは、食べ過ぎや運動不足によって内臓脂肪が蓄積し、高脂血症、高血圧、高血糖を合併した病態を指す¹⁾（診断基準を表1に示す）。この病態が続くと動脈硬化が進行して心筋梗塞や脳卒中などの重篤な心血管系疾患をまねく原因となる。従って、心血管系疾患が発症する前にメタボリックシンドロ

ームの主因となる肥満の予防が重要となる。

肥満の程度は、BMI（Body mass index：肥満度＝体重kgを身長mの二乗で割った値）とい

表1 メタボリックシンドローム診断基準

<p>内臓脂肪蓄積</p> <p>* 腹囲 男性≥ 85cm, 女性≥ 90cm (内臓脂肪面積：男女とも$\geq 100\text{cm}^2$に相当)</p>
<p>上記に加えて以下の2項目以上</p> <p>* 血中の中性脂肪含量 $\geq 150\text{mg/dl}$ 又は HDL コレステロール含量 $< 40\text{mg/dl}$</p> <p>* 収縮期血圧 $\geq 130\text{mmHg}$ 又は 拡張期血圧 $\geq 85\text{mmHg}$</p> <p>* 空腹時血糖 $\geq 110\text{mg/dl}$</p>

う簡単な指標をもとに定義することができ、BMIが25を超えると太り過ぎて肥満であると判断される。運動やダイエットにより比較的短期間に脂肪を減らすことが可能であることから、肥満を病気だと思っている人は少ないが、肥満状態が続くとメタボリックシンドロームとなり様々な生活習慣病を発症する確率が大きく上昇することになる。この肥満における陰の主役が「脂肪細胞」であり、脂肪細胞の集まりが脂肪組織である。

2. 白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞

脂肪は大切な栄養素の一つであり、完全に燃焼すると糖や蛋白質の2倍以上のエネルギーを放出する。多くの動物は進化の歴史の中で飢餓や寒さに備えるために中性脂肪を貯蔵する白色脂肪細胞（一般的にいう脂肪細胞）と中性脂肪をエネルギー源として熱をつくり体温を維持する褐色脂肪細胞を発達させてきた。つまり、白色脂肪細胞は燃料タンク、褐色脂肪細胞はヒーターという役割である。太古の昔には、十分な食べ物を常に確保することは難しかったので、厳しい自然の中で生き延びるためには獲得した食物エネルギーを中性脂肪のかたちで白色脂肪細胞に蓄えることが必要であった。同時に、ヒトを含む恒温動物は極寒の中でも体温を常に一定に保たなければ生きていけないので、貴重な貯蔵エネルギーである中性脂肪を効率良く燃やし熱を産み出す褐色脂肪細胞が必要であったと考えられる。

これら二種類の脂肪細胞の働きは脳-交感神経系により調節される。例えば、寒冷環境下では皮膚に存在する感覚神経を介して“寒い！”という情報が脳に伝えられると、交感神経が刺激されてその神経末端からノルアドレナリンが分泌される(図1)。続いて、ノルアドレナリンは白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の細胞膜上に存在する $\beta 3$ アドレナリン受容体($\beta 3$ -AR)を活性化し、白色脂肪細胞においては貯蔵されている中性脂肪を分解して脂肪酸がつくられる。一方、褐色脂肪細胞ではアンカッピングプロテイン1(UCP1)という特殊な熱産生タンパク質が活性化されて脂肪酸を燃料として熱をつくり体温の低下が抑えられる。食事の際にも交感神経が活性化され脂肪分解と熱産生が起こる。最終的には、食事で摂取するエネルギー量が身体活動で消費するエネルギー量を上

回ると余ったエネルギーが中性脂肪として白色脂肪細胞に蓄積される(図2)。しかし、一つの白色脂肪細胞が貯め込む中性脂肪量には限界があるので、余剰のエネルギーをさらに貯め込むために脂肪前駆細胞(未分化の脂肪細胞)が分化して白色脂肪細胞の数が増える。すなわち、肥満は中性脂肪を蓄積した白色脂肪細胞が増加して白色脂肪組織量が大きくなった状態である。

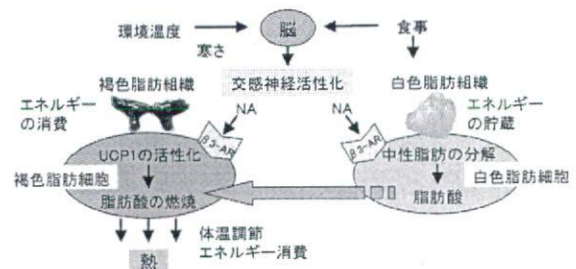


図1 脂肪細胞の役割。脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の2種類がある。白色脂肪細胞は摂取したエネルギーを中性脂肪のかたちで貯蔵するが、中性脂肪の過剰な蓄積は肥満の原因となる。寒さや食事などにより交感神経が活性化されて分泌されたノルアドレナリン(NA)は、脂肪細胞上の $\beta 3$ アドレナリン受容体($\beta 3$ -AR)に作用し白色脂肪細胞における中性脂肪の脂肪酸への分解を促進する。同時に、褐色脂肪細胞のアンカッピングプロテイン1(UCP1)が活性化されて脂肪酸を燃焼し熱を産み出す。

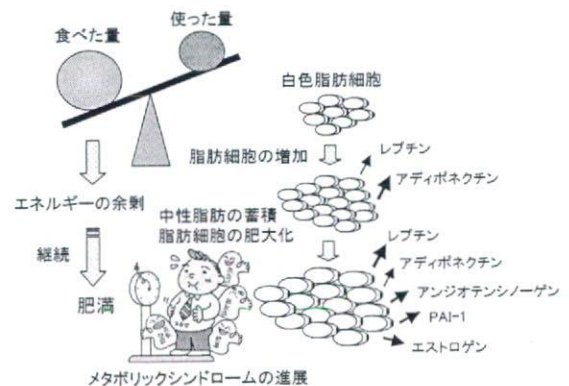


図2 肥満と脂肪細胞の関係。肥満は食べた量が使った量を上回ることによるエネルギーバランスの乱れが継続することにより進行する。一つの白色脂肪細胞が貯蔵できる中性脂肪量には限界があるので、余剰のエネルギーを蓄積していくために新しい脂肪細胞が生まれ細胞数が増加する。一方、脂肪細胞はレプチン、アディポネクチン、アンジオテンシノーゲン、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-1(PAI-1)、エストロゲンなど、様々なホルモンや生理活性分子をつくる。これらの血中レベルは肥満と共に変化し、メタボリックシンドロームの病態発症に関与する。

3. 肥満と脂肪細胞

上記の基本的役割に加えて、脂肪細胞の新たな機能が近年明らかとなってきた。すなわち、脂肪細胞は単なる燃料タンクやヒーターではなく、種々のホルモンや生理活性分子をつくる内分泌細胞であることがわかってきた²⁾(図2)。脂肪細胞が分泌するホルモンとして最初に見つかったレプチンは、食欲を抑制するホルモンで肥満の程度と比例して血中レベルが上昇する。また、レプチンは交感神経を活性化して褐色脂肪細胞における熱産生を促進してエネルギー消費を高める作用がある。その他にも、糖および脂質の代謝調節に係わるアディポネクチン、血液の凝固に係わるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1)、血圧調節に働くアンジオテンシノーゲン、あるいは女性ホルモンであるエストロゲンなど、脂肪細胞は驚くほど多様な分子をつくる。

最近の研究から、内臓脂肪が蓄積すると脂肪細胞の働きが悪くなりアディポネクチンの分泌量が低下して、脂肪細胞だけではなく肝臓や筋肉などにも中性脂肪が蓄積しインスリン抵抗性や高脂血症の原因となることがわかってきた。一方、脂肪細胞によるPAI-1合成が上昇し血栓の形成が促進されて動脈硬化が進行する。加えて、アンジオテンシノーゲン合成の上昇による血圧上昇など、内臓肥満をベースとしてメタボリックシンドロームが進むことになる。

4. 従来の肥満予防法

食べる量を減らし、適度な運動を行なうことが肥満にならないために重要であることは誰しも分かっていることである。しかし、肥満者の数が増え続ける現状をみると話はそれほど簡単ではないようである。従って、エネルギー摂取を減らす、あるいはエネルギー消費を高めることにより肥満を予防または治療する薬剤の開発が行われてきた。その一つは、前述の $\beta 3$ -ARの活性化による褐色脂肪細胞の熱産生を介してエネルギー消費を促進し肥満を予防する $\beta 3$ -AR活性化剤の開発である(図1)。しかし、褐色脂肪細胞はリスやマウスなど小型のげっ歯類では今なお必須の熱産生器官であるが、断熱と保温の効いた衣と住の中でくらす現代人では一般的に褐色脂肪細胞は生後急速に消

退し、成人以降UCP1を検出することが難しい。また、 $\beta 3$ -ARには遺伝子多型が存在し、褐色脂肪細胞の熱産生が活性化されにくい日本人の割合は3-4割に達するとみられることから、 $\beta 3$ -AR活性化剤の効果には個人差があり有効性にも限界があると予想される。実際に、マウスなどの実験動物で有効な $\beta 3$ -AR活性化剤がヒトでは効果が十分認められず今尚利用されるに至っていない。最近我々は、UCP1を欠損するマウス(UCP1-KOマウス)が高脂肪食の摂取により肥満となること³⁾、 $\beta 3$ -AR活性化剤はUCP1-KOマウスの肥満を予防することができないこと⁴⁾を明らかにしている。

一方、植物など天然素材に含まれる種々の化合物に肥満を予防する作用が見出されている。 α -リポ酸は摂食抑制作用とUCP1熱産生活性化作用により抗肥満効果を示す生体分子であり、健康補助剤として注目を集めている。食品機能を利用した肥満予防としては、古くから食材として使われてきた唐辛子に含まれるカプサイシンがその代表として挙げられる。カプサイシンは強力な血管拡張作用により末梢からの熱放散を促進し、交感神経及び褐色脂肪細胞を活性化してUCP1熱産生を亢進することにより肥満予防効果を発揮すると考えられる。最近、辛みのないカプサイシン類縁体が見出され市販されはじめている。同様に、薬用植物として利用されてきたゴシュユの主要成分であるエボジアミンがカプサイシンと類似の肥満予防効果を有することが報告された⁵⁾。しかしながら、UCP1熱産生機能をほとんど喪失したヒトにおいて、これらの機能性化合物が抗肥満作用を本当に発揮することができるのか疑問がもたれた。

5. エボジアミンの新しい抗肥満作用

我々は、カプサイシンと異なり辛みがないエボジアミンを0.03%の濃度で配合した高脂肪食を調製し、正常マウスとUCP1-KOマウスに2ヶ月間食べさせてエボジアミンの肥満予防効果を検討した。その結果、エボジアミンは高脂肪食によるUCP1-KOマウスの肥満の進展を正常マウスと同様に抑制することが明らかとなった⁶⁾。すなわち、エボジアミンを添加した高脂肪食を摂取したマウスでは、高脂肪食のみを摂取したマウスに比べて、摂食量に差はみられなかったが、体重や肥満度

エボジアミン (Evodiamine)

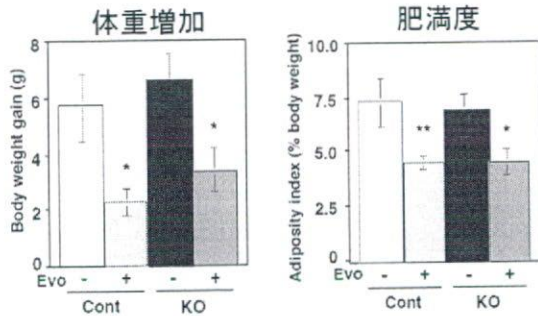
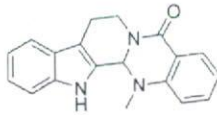


図3 エボジアミンはUCP1の有無に係わりなく高脂肪食により誘導されるマウスの肥満を抑制する。UCP1-KOマウス (KO) とコントロールマウス (Cont) に4ヶ月齢から2ヶ月間、高脂肪食又は高脂肪食にエボジアミン (Evo) を0.03%の濃度で添加した飼料を与えた時の体重増加と肥満度を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Evo-無添加群 (文献6より改変)

(脂肪組織量の体重に占める割合) などの有意な低下が観察された (図3)。また、肥満に伴うインスリン抵抗性や脂肪肝の改善なども認められ、エボジアミンがUCP1の有無に係わりなく抗肥満作用を示すことが明らかとなった。これらの結果は、エボジアミンがUCP1熱産生機能を十分に活性化できないヒトの肥満に対しても効果を発揮する可能性を強く示唆するものと考えられた。それでは、エボジアミンはどのような作用メカニズムで抗肥満作用を発揮するのであろうか?

肥満が進行する過程では、脂肪細胞は過剰なエネルギーを中性脂肪としてより多く蓄えるために肥大化するが、それと同時に、分化成熟した脂肪細胞の数の増加が肥満の進展における重要な要素となる。そこで我々は、エボジアミンの脂肪細胞に対する直接作用を3T3-L1脂肪前駆細胞 (未分化の脂肪細胞) 培養系を用いて検討した (図4A)。その結果、エボジアミンは3T3-L1脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化と中性脂肪の蓄積を濃度依存的に阻害することが明らかとなった (図4B)。また、エボジアミンは脂肪細胞の分化を制御する転写因子C/EBP β およびPPAR γ 蛋白質の発現を強く阻害することが判明した (図4C)。以上の結果は、エボジアミンが脂肪細胞分化の初期において作用し、分化に必須の転写因子の発現を抑

制し脂肪細胞分化を阻害することを示すものと考えられた。

肥満に伴い血中レベルが上昇するインスリンは、脂肪細胞の分化と中性脂肪の蓄積を促進する。インスリンは脂肪細胞分化の初期においては種々のシグナル伝達分子の活性を調節し、上記の転写因子の発現に影響することが知られている。そこで次に、エボジアミンのシグナル伝達分子に対する影響について検討した。その結果、エボジアミンはインスリンによって調節される種々のプロテ

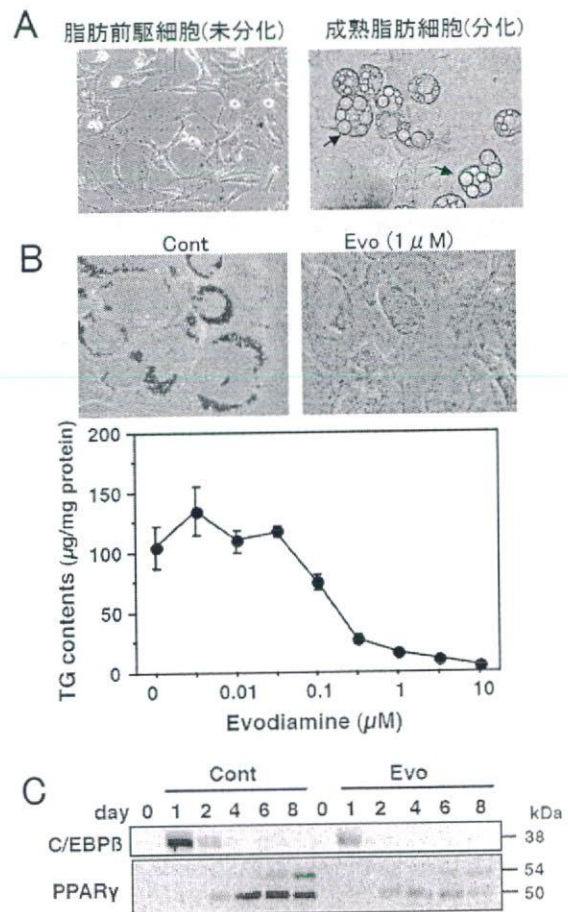


図4 脂肪細胞の分化に対するエボジアミンの効果。A) 未分化の細長い繊維状の3T3-L1脂肪前駆細胞と分化後の成熟した脂肪細胞 (矢印, 脂肪滴を蓄えている)。B) エボジアミンによる脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化と中性脂肪 (TG) の蓄積の阻害。上段: コントロール培地 (Cont) と1 μ Mのエボジアミン (Evo) を添加した培地において8日間培養した後、中性脂肪をオイルレッドO染色 (赤色) した細胞の写真。下段: 細胞内の中性脂肪含量。C) エボジアミンは脂肪細胞の分化に重要な転写因子であるC/EBP β とPPAR γ の発現を強く阻害する。8日間培養した時の各タンパク質の発現量の経時変化をウエスタンブロット解析により調べた。(文献6より改変)

ンキナーゼの活性に影響し、脂肪細胞の分化を阻害することが明らかとなった。面白いことに、カプサイシンにはこれらの作用は検出されず、脂肪細胞分化阻害効果は認められなかった⁸⁾。

6. まとめ

現在までの研究から明らかとなったエボジアミンの抗肥満メカニズムを図5に示した。まず、エボジアミンはカプサイシンと類似の血管拡張作用により体表面からの熱放散を促進する⁷⁾。次に、熱放散による体温低下を抑えるために交感神経が活性化され、白色脂肪細胞の中性脂肪の分解と褐色脂肪細胞におけるUCP1熱産生を亢進しエネルギーを消費する。一方、エボジアミンは脂肪前駆細胞に直接作用し、脂肪細胞分化に重要なシグナル伝達分子の活性に影響を与えることにより分化の進行を抑制する。エボジアミンはこれらの2つの抗肥満作用を併せ持つことにより、UCP1熱産生機能を十分活性化できないヒトに対してもその効果が期待される新しい機能性化合物といえる。エボジアミンが作用する受容体は未だ不明であり、エボジアミン受容体の同定は新たな創薬につなが

るものとしてその解明が待たれる。

用語解説

1. 遺伝子多型

ヒトの遺伝情報はおよそ30億塩基対のDNAの中書き込まれているが、その遺伝暗号には個人差がある。この遺伝暗号の違いを遺伝子多型とよぶ。一つの遺伝暗号の違いにより合成されるアミノ酸が変化してタンパク質の機能が変わることもある。

2. 機能性化合物

個体の生理機能や細胞応答に影響を与える生理活性をもつ化合物の総称。植物に含まれるフラボノイドやポリフェノールはその代表。エボジアミンは、ミカン科植物の呉茱萸（ゴシュユ）に含まれるアルカロイド成分。ゴシュユには、健胃、利尿、鎮痛作用などがあり、古くから漢方において生薬として利用されてきた。エボジアミンの薬理作用としては、ほかに冷え性や脳機能改善、抗炎症、抗ガン作用などが報告されている。

3. インスリン抵抗性

インスリンは、細胞内へのグルコースの取込み

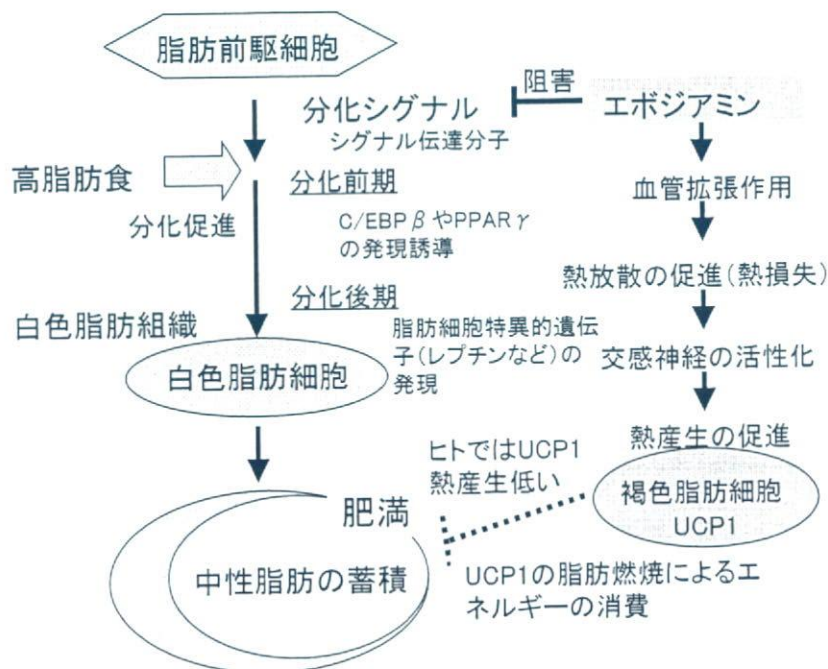


図5 エボジアミンの抗肥満メカニズム。白色脂肪細胞の増加による中性脂肪の蓄積は肥満の主要な病態である。エボジアミンは脂肪前駆細胞に直接作用し、白色脂肪細胞への分化を阻害する。また、エボジアミンはカプサイシンと類似の熱放散作用を介して間接的に褐色脂肪細胞のUCP1熱産生を活性化してエネルギー消費を高める作用も併せ持つと考えられる。

と利用を促進して血中のグルコース濃度（血糖値）を低下させるホルモンであり、糖代謝の調節に重要な役割を果たす。インスリン抵抗性とは、インスリンの糖代謝調節作用が障害を受けた状態をいい、肥満に伴い生じることが多い。

4. 転写因子

主に核内に存在し、DNAに結合してmRNAの合成（遺伝子の転写）を調節するタンパク質。

5. シグナル伝達分子

細胞外の情報を細胞内に伝達し、種々の細胞応答を誘導する過程で働く分子。さまざまなタイプのシグナル伝達分子がある。プロテインキナーゼは特定のタンパク質にリン酸基を付加（リン酸化）してその活性や機能を調節することにより情報の流れや量を調節する酵素であり、プロテインキナーゼ自身もシグナル伝達分子として作用する。

- 7) 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. *Pflüger Arch.-Eur. J. Physiol.*, 452: 363-369, 2006.

参考文献

- 1) 松澤佑次監修. メタボリックシンドローム実践ハンドブック. メディカルトリビューン社. 2006.
- 2) 春日雅人他監修. 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. 2007.
- 3) Kontani, Y., Wang, Z., Kimura, K., Inokuma, K., Saito, M., Suzuki-Miura, T., Wang, Z., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell*, 4: 147-155, 2005.
- 4) 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.
- 5) Kobayashi, Y., Nakano, Y., Kizaki, M., Hoshikuma, K., Yokoo, Y., Kamiya, T. Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist. *Planta Med.*, 67: 628-33, 2001.
- 6) Wang, T., Wang, Y., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. Evodiamine improves diet-induced obesity in a UCP1-independent manner: Involvement of anti-adipogenic mechanism and ERK/MAPK signaling. *Endocrinol.*, 149: 358-366, 2008.

著 者

山下 均 (Hitoshi YAMASHITA)

中部大学生命健康科学部生命医科学科、教授。
1980年名古屋大学農学部農芸化学科卒。旭化成工
業医薬開発センター主査、防衛医科大学校助手、
国立長寿医療センター室長、および名古屋大学大
学院医学研究科助教授を経て2006年4月より現職。
医学博士。専門は分子遺伝学、老化基礎科学。主
な研究テーマは体熱制御の分子機構の解明と老化
や生活習慣病発症におけるその役割。

老化・老年病研究 のための 動物実験ガイドブック



日本基礎老化学会 編

アドスリー

エネルギー代謝 モデル動物

中部大学 生命科学部 山下 均

エネルギー代謝は生命活動を支えるためのエネルギー利用と貯蔵のしくみであり、糖質と脂質の代謝調節がその中心となる。エネルギー代謝は広範な生体応答や代謝性疾患と関連することから、モデル動物の開発も盛んに行なわれ研究に利用されている。代謝性疾患は老化とともに進行するものも多いので、その病態解明や予防法・治療法の開発においては、加齢や老化という視点を踏まえた動物実験の実施が重要である。実験内容としては、基本的なエネルギーの摂取から消費における表現型の解析から、組織や細胞内における分子動態の解析まで幅広い。なお、エネルギー代謝は環境要因により大きく影響されるので、実験条件の設定には十分な配慮が必要である。

1. 動物実験の準備

動物の選択

動物実験の実施において、使用する動物の種類や系統の選択はきわめて重要である。哺乳動物を用いる実験では、飼育管理がしやすく系統が豊富なマウスとラットが重要な実験動物となっている。とくにマウスは、発生工学技術に基づく遺伝子組み換えマウスの利用が一般化し、エネルギー代謝に関連する遺伝子のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスも多数作られ利用されている。近交系マウスとしては、遺伝学研究のスタンダードでもあるC57BL/6マウスが最もよく使われている。C57BL/6マウスは繁殖力が高く長生きで、雄は肥満になりやすい形質をもつことから食餌誘導性の肥満モデルとして使われる。

エネルギー代謝の研究を行う場合、性別に加えて、実験動物の月齢には

とくに注意が必要である。標準飼料の自由摂食下で飼育された雄C57BL/6マウス（平均寿命：およそ28月）の場合、18月齢くらいまで体重は増え続ける。性成熟は2月齢くらいまでに終了するが、個体の成熟が完了する5月齢くらいまでは代謝量と体重変化が大きいので、とくに注意が必要である。

飼育条件

エネルギー代謝は温度環境により大きく変化し、中立温度域(thermoneutral zone：体温維持に必要な代謝量が最小となる環境温度。マウスの場合、30℃前後)で最も低く、環境温度が下がると代謝量は上昇する。動物飼育室の温度は、一般的に21～25℃と施設により異なり、エネルギー代謝も室温に応じて変わるので注意が必要である。通常、エネルギー代謝の変化は摂食量の変化と相関し、低温環境では摂食量が増える。

使用する飼料の組成も実験動物のエネルギー代謝に大きく影響する。一般飼育で使用する標準飼料は、メーカーにより若干異なるが、総カロリーに占める脂肪由来のカロリー比が10%程度の低脂肪食である。研究目的に応じて、脂肪含量をカロリー比40～60%まで増やした飼料、コレステロールを3% (wt/wt) 程度まで増やした飼料、蔗糖や果糖を高濃度 (50～60% wt/wt) に含有する飼料などが利用される。添加する脂肪や炭水化物の種類も様々で総カロリー量も違うので、成分表を確認して使用する。

2. 生理学的解析

エネルギー代謝と関連する種々の指標について、食餌や薬物の投与前後の変化を連続的に捉える個体レベルの解析は重要であり、貴重なデータを得ることができると期待される。体重と摂食量は最も基本的かつ簡便な指標であり、代謝量の違いや変化を予測する上の基礎データとなる。グループ間での代謝量の違いを厳密に調べたい時には、同じ量の餌を与えるペアフィーディング法を用いる。自動的に決まった量の餌を与えるペアフィーディング装置も販売されている。

度センサーを腹腔内に埋め込む方式が用いられるようになってきた。この方法では、高価な装置とセンサーの埋め込み手術が必要であるが、実験動物を固定したりすることによるストレスを与えずに体温を24時間継続して測定することができる。

生体内では基本的に必要以上の熱が生成しているため、体温を一定に保つために余剰の熱は主として皮膚表面から体外に放出されるが、この熱放射量に応じて皮膚温（体表温度）が変化する。したがって、エネルギー代謝の結果生じた熱量と相関して皮膚温が上昇する。実際に、食事後には熱産生量が増加し、それに応じて皮膚温が上昇することが観察される。マウスやラットの場合、表面積が大きく体毛のない尾部が熱放射散において重要な役割を果たしており、尾部皮膚温を測定する³⁾。測定には、赤外線放射エネルギーを利用した温度測定（サーモグラフィ）が用いられる。ただし、皮膚温は環境温度の影響を大きく受けるので、測定は常に一定の室温環境下で行わない評価する必要がある。

行動量測定

運動によりエネルギー消費は上昇するので、行動量（自発運動量）を調べることにし、エネルギー代謝の変化を予測することができる。実際には、体温測定や間接的熱量測定と組み合わせることにより、連続的なエネルギー代謝の変化を解析することが可能となる。

糖代謝試験

全身における糖代謝能を調べる場合には、耐糖能試験（glucose tolerance test: GTT）を行う。マウスを用いる場合、GTTでは一晩絶食させた動物に対してグルコース溶液（1~2 g glucose/kg body weight）を経口または腹腔内投与した後、経時的（0, 30, 60, 120分など）に血糖値を測定する。採血は尾静脈から行い市販の簡易血糖測定器を用いると、ごく少量（1滴程度）の血液で血糖をすばやく測定できるので便利である⁴⁾。マウスでは、老化とともに耐糖能の増悪が認められる。各組織における糖利用を解析する場合には、2-デオキシグルコース（2-deoxyglucose: 2-DG）の取り込み試験を行う。麻酔下の動物に2-[³H]DGを静注した後、血液と組織を採取し、血中からの2-[³H]DGの消退と各組織への2-[³H]DGの取込みを測定する⁵⁾。また、インスリン応答性の糖取込み能を調べるインスリン負荷

間接的熱量測定：Indirect calorimetry
生体内で燃焼された食物のエネルギー量を直接測定することはできない。しかし、食物の燃焼に利用される酸素（O₂）量は、生成したエネルギー量と比例関係にあるので、単位時間内におけるO₂消費量（oxygen consumption）を測定することにより、間接的にエネルギー消費量（energy expenditure）を求めることができる¹⁾。現在、小型動物の間接的熱量測定を行う装置がいくつものメーカーから市販されている。原理的には、実験動物を入れたチャンバー内への空気の流れを一定に保ちながら、チャンバーから排出されるO₂と二酸化炭素（CO₂）の濃度変化を測定することによりO₂摂取量とCO₂排泄量を算出する。1リットルのO₂消費により4.82 kcalが使われたとして、エネルギー消費量を求めることができる。マウスやラットの場合は、エネルギー消費量は摂食や活動量の上がる暗期で高く、睡眠などで活動量の下がる明期で低い。

また、O₂摂取量とCO₂排泄量から呼吸商（respiratory quotient, RQ: CO₂モル/O₂モル）を求めることにより、おもに利用されたエネルギー源の種類を知ることができる。たとえば、燃焼された栄養素がすべてグルコースなどの炭水化物の場合にはRQ=1.0、すべて脂肪の場合にはRQ=0.7となる。実際には、その中間の値をとることが多いが、絶食時や寒冷暴露時、あるいは高脂肪食を摂取している場合などは脂肪利用の比率が高くなりRQは0.7に近づく。

体温、皮膚温測定

ヒトと同様にマウスやラットでは、体温（核心温度：core temperature）はほぼ一定（37~38℃）に保たれているが、厳密には小さな日内変動（サーカディアンリズム）があり覚醒時に高く睡眠時に低い。体温はエネルギー代謝の結果生じた熱により調節されているので、代謝量の上昇する活動時に体温は上がり、安静時には下がることになる。メカニズムは違いますが、体温の上昇する運動時や発熱の際にもエネルギー消費が亢進するので、体温はエネルギー代謝の変化を示す指標の1つと言える。

実験動物の場合、ワセリンを塗った温度センサーを直腸に挿入して体温を測定する簡易法が用いられてきたが、覚醒状態ではハンドリングなどのストレスにより体温は上昇してしまうので熟練を要する⁶⁾。マウスやラットでは、老化とともに体温の低下が観察される。最近では、ワイヤレスの温

試験 (insulin tolerance test : ITT) やインスリンに対する感受性や抵抗性を調べることでできるインスリンクランプ試験などがある。詳細は老年病態モデル編を参照されたい。

脂質代謝試験

実験動物における脂肪分解能や脂質の取込みを調べる方法などがある。脂肪細胞における中性脂肪の分解は、 β アドレナリン受容体を介してホルモン感受性リパーゼの活性化により進むので、ノルアドレナリンなどの β アドレナリン受容体アゴニストを一晚絶食した動物に投与し、中性脂肪が分解されて生成した遊離脂肪酸の血中レベルを経時的に測定する⁷⁾。動物から摘出した脂肪組織を細切し、試験管内においてノルアドレナリンなどで刺激し生成した遊離脂肪酸を測定することにより脂肪分解活性を調べることもできる⁸⁾。脂質の取込み試験 (fat-loading test) では、脂質エマルジョン溶液を静注した後、血中遊離脂肪酸のクリアランスを調べる。血中サンプルなどの遊離脂肪酸レベルは、市販の測定キットを用いて簡便に測定することができる。

ミトコンドリア機能試験

ミトコンドリアにおける脂肪酸の酸化 (β 酸化) は、脂肪を利用するエネルギー代謝の重要なステップであり脂肪酸を分解してアセチルCoAを生成する。実験動物における β 酸化活性を調べる方法としては、肝臓など各種組織の抽出液を調製し試験管内において [14 C]- β パルミチン酸の酸化分解による [14 C]-アセチルCoAの生成を水溶性分画の [14 C] 標識量として捉え評価する方法がある⁹⁾。また、組織からミトコンドリア分画を調製し、Clark型酸素電極を用いて呼吸活性を調べることができる⁷⁾。

その他

肝臓や骨格筋などの組織に含まれる脂質やグリコーゲン含量が測定される。各エネルギー源の抽出法としては、脂質の場合はクロロホルム：メタノール (2 : 1) を用いるFolchら¹⁰⁾の方法がよく用いられる。グリコーゲンの場合は、アルカリ分解した組織から抽出したグリコーゲンをフェノール-硫酸反応により定量する方法などが用いられる⁹⁾。詳細な手法については、生化学実験の専門書を参照されたい。

3. 血液生化学的解析

動物実験において得られた血液サンプルを用いて、エネルギー代謝と関連するマーカー分子の測定が行なわれる。主なものとしては、血糖、中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸、各種ホルモン (レプチン、インスリン、アディポネクチン) などが市販の測定試薬やELISAキットを用いて簡単に測定される。また、 β -ヒドロキシ酪酸やサイロイドホルモン、ノルアドレナリンなども脂肪分解や熱産生との関連から調べられる。測定項目により、採血時の処理が異なるので注意が必要である。これらの血液パラメータの測定は、生体における糖質や脂質の代謝状態を知り、肥満やインスリン抵抗性、動脈硬化などの病態を把握する上で重要な情報となる。

4. 遺伝子・タンパク質解析

実験動物を用いた研究では、生理学的解析に加えて種々の組織における遺伝子やタンパク質の発現量あるいは酵素活性が調べられる。遺伝子発現解析の場合、組織から回収した総RNA分画を材料として目的とする遺伝子のmRNAレベルを定量PCR法などで解析する。タンパク質の解析では、全組織抽出液をはじめ、対象とするタンパク質の局在部位によりミトコンドリア分画、膜分画、核抽出液などを調製し利用する。特殊な酵素活性の測定やリン酸化タンパク質の検出などにおいては失活防止用の各種インヒビターの添加が必要であり注意を要する。

参考文献

- 1) Gordon CJ : Temperature Regulation in Laboratory Rodents. Cambridge University Press, 1993.
- 2) Inokuma K, et al. : Am J Physiol Endocrinol Metab, 290:E1014-21, 2006.
- 3) Wang Y, et al. : Pflugers Arch, 452: 363-9, 2006.
- 4) Kontani Y, et al. : Aging Cell, 4: 147-55, 2005.
- 5) Inokuma K, et al. : Diabetes, 54: 1385-91, 2005.
- 6) Murase T, et al. : J Lipid Res, 43: 1312-19, 2002.
- 7) 日本生化学会編 : エネルギー代謝と生体酸化 (上). 生化学実験講座12, 東京化学同人, 1979.
- 8) Folch J, et al. : J Biol Chem, 226: 497-509, 1957.
- 9) Lo S, et al. : J Appl Physiol, 28: 234-6, 1970.

V. モノグラフ

第5次調査

調査概要

形態データ

MONOGRAPH

The Fifth Wave

July, 2006~July, 2008

National Institute for Longevity

Sciences

Longitudinal Study of Aging

NILS-LSA

Objectives and Overview

Objectives and Overview of the NILS-LSA

- 1) Background and outline of the NILS-LSA
- 2) Progress of the NILS-LSA
- 3) Objectives of the NILS-LSA
- 4) Research area
- 5) Subjects
- 6) Implementation of the study
- 7) Informed consent
- 8) Examinations and tests
- 9) Future of the NILS-LSA
- 10) Staff

1) Background and outline of the NILS-LSA

The life expectancy of the Japanese population is the longest in the world. Both the absolute number and relative percentage of the elderly population in Japanese society is rapidly increasing. In 2020, the percentage of the elderly population in Japan will be the largest in the world. Along with these changes, various medical and care-giving problems for the elderly have arisen. Longevity science, with the goal that all of elderly people can live a long life with good physical and mental health should be promoted in Japan.

Human aging is associated with many factors, including not only physical and physiological factors but also social and psychological factors. Thus, research into human aging requires many kinds of examinations and specialists in various areas. In addition, human aging research requires long-term study in which the same subjects are measured repeatedly to observe age-related changes. However, the number of researchers and budget for studies on gerontological and geriatric epidemiology are limited. It has been very difficult in Japan to start and to continue a large-scale and comprehensive longitudinal study of aging, despite a rapid increase in the elderly population.

In 1995, a new national research institute of aging in Japan, the National Institute for Longevity Sciences (NILS) was established as a research facility in Chubu National Hospital and in 1997 the NILS-LSA (NILS-Longitudinal Study of Aging) started. The participants in the NILS-LSA of the first wave were 2,267 males and females aged 40 to 79 years randomly selected from the NILS area. They will be examined every two years and now the 5th wave examination is carrying out. Seven participants were examined every day at the NILS-LSA examination center. The aging process is assessed by detailed questionnaires and examinations including clinical evaluation, body composition and anthropometry, physical functions, nutritional analysis, and psychological assessments. The data from the study will be useful to investigate the causes of geriatric diseases and health problems in the elderly such as depression, mental disturbance, restriction of ADL, low nutrition and physical activity. The data will also be useful to prevent these diseases and health problems in the elderly.

In March 2004, Chubu National Hospital and NILS were reorganized to establish the National Center for Geriatrics and Gerontology as a new national facility for research and medical care. There are six National Centers for Advanced and Specialized Medical Care in Japan. Other National Centers are located in five areas; Cancer Center in Chuo-ku, Tokyo and in Kashiwa-shi, Chiba, Cardiovascular Center in Suita-shi, Osaka, Center of Neurology and Psychiatry in Kodaira-shi, Tokyo and Ichikawa-shi, Chiba, International Medical Center in Shinjuku-ku, Tokyo, and Center for Child Health and Development in Setagaya-ku, Tokyo. They provide advanced medical care and conduct researches in each special medical area.

Chubu National Hospital was reorganized as National Hospital for Geriatric Medicine. The