

inhibition of inflammatory cell infiltration, and the buffering activity in WAT may represent beneficial factors that contribute to the anti-aging and pro-longevity effects of CR. The plasma levels of IGF-1, insulin, adiponectin, and leptin in these rats have been reported elsewhere (Higami et al. 2006b; Yamaza et al. 2007). Briefly, the plasma IGF-1 and insulin concentrations were highest in WdAL rats, followed by WdCR rats, then TgAL, and lowest in TgCR rats, suggesting that plasma insulin concentrations correlate with plasma IGF-1 levels. In contrast, the levels of insulin and IGF-1 did not correlate with adipocyte size and adiposity. Therefore, adipocyte size and adiposity are not simply regulated in a GH-IGF-1- and/or insulin-dependent manner. Plasma adiponectin concentrations were higher in WdCR and TgAL rats than in WdAL rats. Plasma leptin concentrations were highest in WdAL rats, followed by TgAL rats, and lowest in WdCR rats. Because the plasma IGF-1 concentrations did not correlate with the plasma adiponectin or leptin concentrations among the three groups, it is likely that these parameters do not depend on IGF-1. However, continuous infusion of recombinant IGF-1 suppressed the CR-associated increase in plasma adiponectin levels (Yamaza et al. 2007). Moreover, CR and Tg equally enhanced glucose tolerance and insulin sensitivity (Yamaza et al. 2004). Therefore, the CR-associated adipokine profile, including adiponectin and leptin, and insulin sensitivity may be regulated, in part, in a GH-IGF-1-dependent manner.

Our transcriptome analysis combined with PC analysis revealed that CR upregulated several genes involved in lipid biosynthesis (GO 0008610, 0006633, and 0019432) and downregulated several genes associated with inflammation (GO 0006955, 0006954, 0034097, and 0030593; Fig. 2a and b and Table 2). These findings support our previous transcriptome analysis in mice (Higami et al. 2004, 2006a). We also found that CR was more effective than Tg in modulating these genes. Our data also demonstrated that the CR-associated changes in the expression of genes involved in lipid biosynthesis and inflammation occurred in a GH-IGF-1-independent manner (Fig. 2a and b).

Previously, we reported that in the liver of both wild-type and Tg rats, with the same background used in the present study, CR induced the expression of genes involved in fatty acid biosynthesis, probably via SREBP-1 (Higami et al. 2006b). SREBPs, transcription factors

belonging to the basic helix-loop-helix-leucine zipper family, are master regulators of lipid metabolism and adipocyte differentiation. The three SREBP isoforms (1a, 1c, and 2) are expressed at varying levels in different tissues and act as homo- and hetero-dimers to activate gene expression (Osborne 2000; Osborne and Espenshade 2009). All three SREBPs are synthesized as long inactive precursors. They are bound to membranes of the endoplasmic reticulum (ER), where the C-terminal regulatory domain of SREBPs interacts with SCAP (Osborne and Espenshade 2009). SCAP escorts SREBPs from the ER to the Golgi apparatus, where they are cleaved sequentially by site-1 and site-2 proteases, to yield the active proteins. The active SREBPs consist of an NH₂-terminal domain and can enter the nucleus to activate transcription (Osborne and Espenshade 2009). SREBP-1a and SREBP-1c are encoded by a single gene and are transcribed by alternate promoters. They stimulate the expression of genes that are preferentially involved in fatty acid and triglyceride biosynthesis. In contrast, SREBP-2 is encoded by a different gene and induces the expression of genes predominantly involved in cholesterol biosynthesis (Osborne 2000; Osborne and Espenshade 2009). When we compared our data with the SREBP-1- and SREBP-2-regulated genes listed by Horton et al. (2003), we found that in wild-type rats SREBP-1-regulated genes were exclusively upregulated by CR, whereas SREBP-2-regulated genes were not (Fig. 2c and d). Subsequent real-time RT-PCR analysis confirmed that CR, but not Tg, upregulated the expression of the SREBP-1-regulated genes, *FASN* and *ACCI*. In contrast, CR and Tg did not upregulate the SREBP-2-regulated genes, *Sqle* and *Mvk* (Fig. 3). The CR effect on the expression of *SREBP-1* and the regulated genes was further confirmed in Tg rats (Fig. 4a and b). Therefore, we concluded that CR preferentially enhances the expression of SREBP-1-regulated genes, but not SREBP-2-regulated genes, in a GH-IGF-1-independent manner.

As described above, inflammatory cells, particularly macrophages, preferentially infiltrate into the WAT of obese animals (Ouchi et al. 2011). The majority of previous studies have examined F4/80 expression as a marker to identify adipose tissue-specific macrophages (Lumeng et al. 2007). MCP-1, which shows increased expression in WAT of obese animals, promotes adipose tissue inflammation and macrophage recruitment (Kanda et al. 2006). Therefore, we measured the expression of genes encoding *F4/80* and *MCP-1* in wild-type and Tg rats (Figs. 3d and 4c). We found that CR, but not

Tg, reduced the expressions of *F4/80* and *MCP-1*, suggesting that CR suppresses macrophage infiltration by decreasing the expression of *MCP-1* in a GH-IGF-1-independent manner. Lumeng et al. (2007) reported that the $F4/80^+CD11c^+$ population of macrophages, a characteristic of M1 macrophages, was present in WAT of obese mice, but not in lean mice. In contrast, the macrophages in WAT of lean mice expressed many genes characteristic of M2 macrophages. Thus, obesity leads to a shift in the activation state of macrophages in WAT from an M2-polarized state in lean animals that may protect adipocytes from inflammation to an M1 pro-inflammatory state that contributes to insulin resistance (Lumeng et al. 2007). Unlike WAT in obese animals, our data suggest that the reduced infiltration of macrophages is mainly due to the decreased shift towards $F4/80^+CD11c^+$ M1 macrophages in WAT of both wild-type and Tg CR rats.

In this study, we demonstrated that CR-associated morphological changes preferentially found in WAT of wild-type rats rather than Tg rats are not solely regulated in a GH-IGF-1-dependent manner. Moreover, CR-enhanced lipid biosynthesis and CR-suppressed inflammation were only regulated in a GH-IGF-1-independent manner. In particular, CR-associated activation of lipid biosynthesis was predominantly regulated by SREBP-1. Recently, it has been hypothesized that CR-associated lipid utilization may reduce reactive oxygen species production (Guarente 2008). In fact, SREBP-1-regulated de novo lipid biosynthesis in WAT may play an important role in CR-associated lipid utilization (Okita et al. 2012). In addition, it has been reported that molecular inflammation, which is associated with nuclear factor- κ B activation and enhanced expression of several pro-inflammatory cytokines, is involved in the aging process and is attenuated by CR (Chung et al. 2011). Therefore, we suggest that the activation of de novo lipid biosynthesis by SREBP-1 and the induction of anti-inflammatory conditions by reduced macrophage infiltration are pivotal regulators of CR-associated WAT remodeling, and may be important factors in the beneficial effects of CR.

Acknowledgments We thank Yutaka Araki and Yuko Moriyama (Department of Investigative Pathology, Nagasaki University Graduate School for Biomedical Sciences) for their technical assistance and cooperation. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Japan Society for the Promotion of Science (no. 19590396).

References

- Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A (2005) Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* 146:851–860
- Anderson R, Prolla T (2009) PGC-1 α in aging and anti-aging interventions. *Biochem Biophys Acta* 1790:1059–1066
- Argmann C, Dobrin R, Heikkinen S, Auburtin A, Pouilly L, Cock TA, Koutnikova H, Zhu J, Schadt EE, Auwerx J (2009) Ppargamma2 is a key driver of longevity in the mouse. *PLoS Genet* 5:e1000752
- Bartke A (2005) Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* 146:3718–3723
- Bartke A, Wright JC, Mattison JA, Ingram DK, Miller RA, Roth GS (2001) Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 414:412
- Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, Chen W, Rossetti L (1998) Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J Clin Invest* 101:1353–1361
- Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR (2002) Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25–38
- Blüher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572–574
- Bonkowski MS, Rocha JS, Masternak MM, Al Regaiey KA, Bartke A (2006) Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7901–7905
- Brown-Borg HM, Borg KE, Mellska CJ, Bartke A (1996) Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384:33
- Chiu CH, Lin WD, Huang SY, Lee YH (2004) Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev* 18:1970–1975
- Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, Kim CH, Lee J, Kim HS, Kim ND, Jung JH, Yu BP (2011) Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res* 90:830–840
- Coschigano KT, Clemmons D, Bellush LL, Kopchick JJ (2000) Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology* 141:2608–2613
- Farmer SR (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263–273
- Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE (2001) Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6736–6741
- Frayn KN (2002) Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45:1201–1210
- Gesing A, Masternak MM, Wang F, Joseph AM, Leeuwenburgh C, Westbrook R, Lewinski A, Karbownik-Lewinska M, Bartke A (2011) Expression of key regulators of mitochondrial biogenesis in growth hormone receptor knockout

- (GHRKO) mice is enhanced but is not further improved by other potential life-extending interventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66:1062–1076
- Guarente L (2008) Mitochondria—a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 132:171–176
- Hancock CR, Han DH, Higashida K, Kim SH, Holloszy JO (2011) Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *FASEB J* 25:785–791
- Higami Y, Pugh TD, Page GP, Allison DB, Prolla TA, Weindruch R (2004) Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J* 18:415–417
- Higami Y, Yamaza H, Shimokawa I (2005) Laboratory findings of caloric restriction in rodents and primates. *Adv Clin Chem* 39:211–237
- Higami Y, Barger JL, Page GP, Allison DB, Smith SR, Prolla TA, Weindruch R (2006a) Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. *J Nutr* 136:343–352
- Higami Y, Tsuchiya T, Chiba T, Yamaza H, Muraoka I, Hirose M, Komatsu T, Shimokawa I (2006b) Hepatic gene expression profile of lipid metabolism in rats: impact of caloric restriction and growth hormone/insulin-like growth factor-1 suppression. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:1099–1110
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Gélöën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182–187
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12027–12032
- Jackson JE (2005) A user's guide to principal components. Wiley, New York
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494–1505
- Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K (2010) Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev* 16:105–118
- Konishi T, Konishi F, Takasaki S, Inoue K, Nakayama K, Konagaya A (2008) Coincidence between transcriptome analyses on different microarray platforms using a parametric framework. *PLoS One* 3:e3555
- Koo H-Y, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT (2009) Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 390:285–289
- López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1768–1773
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175–184
- Masoro EJ (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126:913–922
- Masternak MM, Bartke A, Wang F, Spong A, Gesing A, Fang Y, Salmon AB, Hughes LF, Liberati T, Boparai R, Kopchick JJ, Westbrook R (2012) Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. *Aging Cell* 11:73–81
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310:314–317
- Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, Higami Y (2012) Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech Ageing Dev* 133:255–266
- Osborne TF (2000) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 275:32379–32382
- Osborne TF, Espenshade PJ (2009) Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes Dev* 23:2578–2591
- Otobe S, Yuan X, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Hirota N, Kojima M, Yamada K (2007) Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E210–E218
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11:85–97
- Saely CH, Geiger K, Drexel H (2012) Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 58:15–23
- Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280:13560–13567
- Shimokawa I, Higami Y, Utsuyama M, Tsuchiya T, Komatsu T, Chiba T, Yamaza H (2002) Life span extension by reduction in growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis in a transgenic rat model. *Am J Pathol* 160:2259–2265
- Shimokawa I, Higami Y, Tsuchiya T, Otani H, Komatsu T, Chiba T, Yamaza H (2003) Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. *FASEB J* 17:1108–1109
- Sinclair DA (2005) Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 126:987–1002
- Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59–63
- Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Rogero MM, Tirapegui J (2010) The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochem Funct* 28:623–631
- Weindruch R, Walford RL (1988) The retardation of aging and disease by dietary restriction. Charles C Thomas, Springfield
- Yamaza H, Komatsu T, Chiba T, Toyama H, To K, Higami Y, Shimokawa I (2004) A transgenic dwarf rat model as a tool

- for the study of calorie restriction and aging. *Exp Gerontol* 39:269–272
- Yamaza H, Komatsu T, To K, Toyama H, Chiba T, Higami Y, Shimokawa I (2007) Involvement of insulin-like growth factor-1 in the effect of caloric restriction: regulation of plasma adiponectin and leptin. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:27–33
- Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon YA, Brown MS, Horton JD (2001) Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci* 98:13607–13612
- Yu BP (1994) *Modulation of aging processes by dietary restriction*. CRC, Boca Raton

【トピックス】

カロリー制限が白色脂肪組織における脂肪酸合成に及ぼす影響の経時的解析

土屋 拓郎、沖田 直之、須藤 結香、樋上 賀一

東京理科大学 薬学部 薬学科 分子病理・代謝学研究室

はじめに

1935年、米国の栄養学者である McCay らは、適度な摂取カロリーの制限 (caloric restriction; CR) がラットの平均および最大寿命を延伸し、加齢性疾患の発症を抑制または軽減することを報告した [1]。以降、酵母や線虫からげっ歯類を中心とした哺乳類に至るまで様々な生物種において、CR が老化を遅延、平均および最大寿命を延伸することが明らかにされてきた [2-4]。

CR の抗老化・寿命延伸効果には、エネルギー代謝に関わるミトコンドリアが重要な役割を担うと考えられている [5]。また、CR のエネルギー代謝の特徴は、エネルギー効率の高い脂質を利用することである [6]。近年、エネルギーの貯蔵庫であり、放出源でもある白色脂肪組織 (WAT) において、CR がミトコンドリア機能を亢進させ、脂質代謝を活性化させるという報告が数多くなされている [6-8]。我々も、6ヵ月間 CR したラットの WAT をプロテオーム解析し、CR がミトコンドリアや脂肪酸合成に関わるタンパク発現量を増加させることを報告した [9]。本稿では、CR による WAT での脂質代謝変化の経時的な解析から、CR による代謝の分子メカニズムについて報告する。

1. 脂肪細胞の小型化とアディポカイン

WAT における主要な構成細胞である脂肪細胞は、そのサイズによってアディポカイン分泌プロファイルを変化させることが知られている [10]。また、CR に伴い WAT では脂肪細胞が小型化し、アディポネクチンの分泌が増加し、レプチンや多くの炎症性サイトカインの分泌が減少することが知られている [11-13]。アディポネクチンは、肝臓や骨格筋などの非脂肪組織での脂肪蓄積を減少させ、インスリン感受性を亢進させる [14]。また、レプチンは、視床下部の受容体を介して強力な摂食抑制やエネルギー消費を亢進させる [15]。

まず、我々は脂肪細胞の形態学的観察とエネルギー代謝に関連が深いアディポネクチンとレプチンの経時的解析を行った。WAT の組織学的解析において、CR 群の脂肪細胞のサイズは自由摂食 (ad libitum; AL) 群に比

べ5ヶ月齢 (CR 期間2ヵ月) から有意に減少した。アディポカインの解析において、CR 群のアディポネクチンの mRNA 発現量は、3.5ヶ月齢で顕著に上昇した。一方、CR 群のレプチンの mRNA 発現量は、5ヶ月齢から AL 群に比べ有意に減少した (図1)。

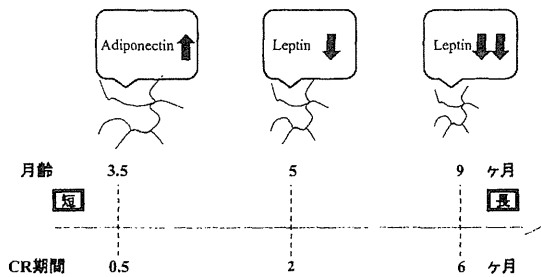


図1 脂肪細胞サイズとアディポカインの経時的変化

2. 脂肪酸合成

前項でも述べたが、我々は6ヵ月間 CR したラットの WAT をプロテオーム解析し、CR が脂肪酸合成に関わるタンパク発現量を増加させることを報告した [9]。また、CR が WAT の脂肪酸合成効率を増加させるという報告もある [6]。

我々は脂肪酸合成において重要な酵素である FASN (Fatty acid synthase)、ACC (Acetyl-CoA carboxylase)、ACLY (ATP-citrate synthase)、ME1 (Malic enzyme1) のタンパク質発現量の経時的変化をウエスタンブロット法により解析した。すると、WAT では、全月齢において CR でこれらの脂肪酸合成関連タンパク質の発現量が顕著に増加した。しかしながら、5ヶ月齢において CR に伴う増加が一時的に抑制された。CR 群のみ経時的に発現量を比べると、5ヶ月齢を境に V 字型を示していた (図2)。次に、3.5、5、9ヶ月

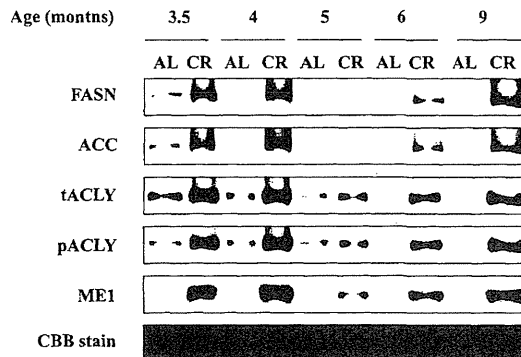


図2 脂肪酸合成関連因子の経時的変化

連絡先：〒 278-851

千葉県野田市山崎 264

TEL：04-7121-3676

FAX：04-7121-3676

E-mail：taku6384@gmail.com

月齢においてこれらの脂肪酸合成関連因子の mRNA 発現量の解析を行った。タンパク質発現と同様の変化が、mRNA 発現でも見られ、CR に伴う経時的な変化は転写レベルで制御されていると考えられた。

3. SREBP1 (Sterol regulatory element-binding protein1)

SREBP1 は basic helix-loop-helix (b-HLH) leucine zipper 型の転写因子であり、*Fasn*、*Acc*、*Acly*、*mel* などの脂肪酸合成系遺伝子発現を正に転写制御する [16-18]。SREBP1 には SREBP1a と SREBP1c の 2 つのアイソフォームが存在する [18]。これらの 2 つのアイソフォームの発現分布は組織によって異なり、SREBP1a は脾臓や骨髄由来マクロファージ、骨髄樹状細胞などの免疫や炎症に関連する臓器および細胞で優位に発現しているのに対し、SREBP1c は肝臓や脂肪組織などのインスリン感受性臓器で優位に発現している [19]。また、細胞内の SREBP1 は、Srebp cleavage activating protein (Scap) と複合体を形成し、SREBP1 自身の膜貫通領域を介して小胞体 (ER; endoplasmic reticulum) 膜に結合している。Sterol が豊富な時には ER 膜上で insulin inducing gene (Insig) と三量体を形成している。Sterol が減少すると Insig との複合体形成が抑制され、Srebp-Scap 複合体がゴルジ体に輸送される。ゴルジ体において、site 1 protease (S1P) および site 2 protease (S2P) により C 末端側を順次切断され、全長を持つ前駆型から bHLH 領域を含む N 末端側のみ活性型となり核内に移行して転写活性を示す [20]。

我々は図 2 の結果より SREBP1 の解析をおこなった。すると、CR 群における前駆型及び核内にある活性型の SREBP1 のタンパク質発現量も、5 ヶ月齢を境に V 字型に変化を示した。また、*Srebp1a*、*1c* の mRNA 発現量を解析したところ、CR 群の *Srebp1a* の mRNA 発現量は、全月齢で AL 群に比べ有意な差は見られなかった。一方、*Srebp1c* の mRNA 発現量は、全月齢で AL 群に比べ高く、特に 3.5 ヶ月齢で有意に高かった。以上より、SREBP1c が CR による脂肪酸合成関連タンパク質の 5 ヶ月齢を境にした V 字型の発現増加に関与していると考え

えられる。

4. インスリンとレプチンによる SREBP1 の調節機構

SREBP1 の転写活性は、インスリンやレプチンによって調節されていることが知られている [21]。インスリンは SREBP1 の転写を促進するが、特に SREBP1c の発現を強く誘導する [22]。この転写機構は、インスリン受容体の下流にある PI3k/Akt 経路に一部依存する。SREBP1c の転写調節因子として同定されているのが Liver X receptor (LXR) である。LXR は SREBP1c のプロモーター部位に存在する LXR-responsive elements (LXRE) を介して、その転写を亢進する [23]。PI3k/Akt 経路の中には、核内移行した pAkt が、LXR を抑制する Forkhead box protein O1 (FoxO1) をリン酸化させ、核外移行させることで、*Srebp1c* の mRNA 発現量を増加させるという知見もある [24] (図 3)。一方、レプチンは脂肪組織で SREBP1c の転写を抑制し、下流遺伝子である *Fasn*、*Acc1*、*Acly*、*Mel* や *LaminB1* の mRNA 発現量を低下させる [25]。また、これらの脂肪酸合成酵素の活性も低下させると報告がある [26]。

我々は SREBP1 の転写調節するインスリンやレプチンに関連した因子の解析をおこなった。核内移行した pAkt のタンパク質発現量は、CR 群の 3.5 ヶ月齢で特に高かった。一方、レプチンのタンパク質発現量は、CR 群の全月齢で低かった。また、レプチンにより発現が低下するという報告がある *LaminB1* のタンパク質発現量は、CR 群の全月齢で高く、レプチンのタンパク質発現量と相関していた。

以上より、CR が脂質代謝に及ぼす影響は、CR の期間によって異なることが明らかになった。短期の CR ではインスリン感受性の亢進により、pAkt の核内移行が増加し、SREBP1c の転写活性を増強する。一方、長期の CR では、レプチンの低下により、SREBP1c の転写活性を増強すると考えられる。よって、CR による WAT での脂質代謝は、インスリンとレプチンが協調して、発現および転写調節される SREBP1c に強く依存することを示唆する (図 3)。

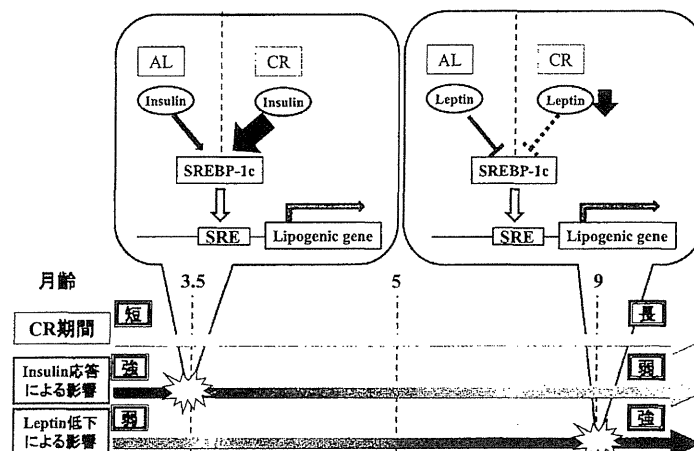


図3 CRによる脂質代謝の経時的変化

おわりに

本研究により、これまで未解明であったCRによる脂質代謝活性化の分子メカニズムの一端を明らかにした。また、CRの期間による経時的な脂質代謝の変化を明らかにした。今後は、CRによる脂肪分解やエネルギー代謝において重要な役割を担うミトコンドリア機能の解析に取り組みたいと考えている。

参考文献

1. McCay, C.M., Cromwell, M.F. and Maynard, L.A. The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 10: 63-79, 1935
2. Sohal, R.S. and Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63, 1996.
3. Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126: 913-922, 2005.
4. Colman, R.J., Anderson, R.M. and Johnson, S. C. et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-204, 2009.
5. Lanza, I.R. and Nair, K.S. Mitochondrial function as a determinant of life span. *Pflügers Arch* 459: 277-289, 2010.
6. Bruss, M. D., Khambatta, C. F. and Ruby, M. A. et al. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E108-16, 2010.
7. López-Lluch, G., Hunt, N. and Jones, B. et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1768-1773, 2006.
8. Nisoli, E., Tonello, C. and Cardile, A. et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317, 2005.
9. Okita, N., Hayashida, Y. and Kojima, Y. et al. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech Ageing Dev.* 133: 255-66, 2012.
10. Ouchi, N., Parker, J. L. and Lugus, J. J. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 11: 85-97, 2012.
11. Bordone, L. and Guarente, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:298-305, 2005.
12. Higami, Y., Pugh, T. D. and Page, G. P. et al. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J.* 18:415-7, 2004.
13. Zhu, M., Lee, G. D. and Ding, L. et al. Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction. *Exp Gerontol.* 42: 733-44, 2007.
14. Zhu, M., Miura, J. and Lu, L. X. et al. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Exp Gerontol.* 39: 1049-59, 2004.
15. Brennan, A. M. and Mantzoros, C. S. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2: 318-27, 2006.
16. Osborne, T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275: 32379-32382, 2000.
17. Amemiya-Kudo, M., Shimano, H. and Hasty, A. H. et al. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res.* 43: 1220-35, 2002
18. Eberlé, D., Hegarty, B. and Bossard, P. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86:839-48, 2004
19. Im, S. S., Yousef, L. and Blaschitz, C. et al. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 13: 540-549, 2011.
20. Xiao, X. and Song, B. SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 45: 2-10, 2013.
21. Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2: 282-6, 2001.
22. Yellaturu, C. R., Deng, X., Cagen, L. M. and Wilcox, H. G. et al. Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *J. Biol. Chem.* 284: 7518-7532, 2009.
23. Yoshikawa, T., Shimano, H. and Amemiya-Kudo, M. et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2991-3000, 2001.
24. Liu, X., Qiao, A. and Ke, Y. et al. FoxO1 represses LXR α -mediated transcriptional activity of SREBP-1c promoter in HepG2 cells. *FEBS Lett.* 584: 4330-4, 2001.
25. Soukas, A., Cohen, P. and Socci, N.D. et al. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* 14: 963-80, 2000.
26. Swierczynski, J. Leptin and age-related down-regulation of lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. *J Physiol Pharmacol.* 57: 85-102,2006.

カロリー制限による抗老化・寿命延伸効果のメカニズム
～脂肪組織のリモデリングと脂質代謝の活性化～

須藤結香 沖田直之 樋上賀一

キーワード：カロリー制限 (CR), 脂肪組織, 脂質代謝, ミトコンドリアバイオジェネシス (MtBio), sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c)
caloric restriction, adipose tissue, lipid metabolism, mitochondrial biogenesis, SREBP1c

抄録：カロリー制限 (CR; caloric restriction) による抗老化・寿命延伸効果のメカニズムについては、成長ホルモン/インスリン様成長因子1シグナルの抑制や酸化ストレスの抑制、サーチュインの活性化、ミトコンドリアバイオジェネシスの亢進など様々な生理 (的適応) 反応が関わることが報告されている。しかしながら、未だその詳細は不明である。我々は、前述のようなCRにより誘導される生理反応の多くが脂肪組織において観察されることから、CRによる抗老化・寿命延伸効果に脂肪組織の改変が重要であると考え研究を行ってきた。そして、脂肪酸合成系の主要な転写因子である sterol regulatory element binding protein 1c がCRに伴う脂肪組織の改変や脂質代謝の活性化、さらには抗老化・寿命延伸に重要であることを示唆する知見を得た。本稿では、近年のCR研究について解説しつつ、我々の最近のデータからCRにおける脂肪組織の重要性を考察する。

(自律神経, 50:192~195, 2013)

背景

カロリー制限 (CR; caloric restriction) は、げっ歯類の平均および最大寿命を延伸し、加齢にともなう生理的・病理学的変化を抑制する⁸⁾¹⁹⁾。この時、摂取エネルギーの減少に適応するため、全身の代謝が変化する。Holliday はCRによる抗老化・寿命延伸効果のメカニズムを、進化論的観点から、以下のように考察した⁹⁾。食餌が豊富な時期には、強い大きな個体で積極的に生殖することで子孫を増やし、さらに過剰なエネルギーを脂肪組織 (WAT) に貯蔵する。一方、食餌が不足する時期には、個体の成長や生殖を抑制し、WAT に貯えたエネルギーを使いながら、寿命を延伸し、食餌が十分に得られる時期を待つ。このような食餌不足に対する適応能力の発達した動物が、進化の過程で選択されてきた。CR は、この食餌不足に対する適応反応を活性化し、抗老化・寿命延伸をもたらす。

CRによる抗老化・寿命延長効果の詳細な分子メカニズムは未だに不明な点が多く、議論の分かれるところであるが、近年、以下に示すような複数のメカニズムの関与が示唆されている。

1. CRによる成長ホルモン/インスリン様成長因子1シグナルの抑制

CRにより、成長ホルモン (GH) やインスリン様成長因子1 (IGF-1) の分泌が減少する⁸⁾¹⁹⁾。また、Ames 矮小マウスや Snell 矮小マウス、GH 受容体/結合タンパク質ノックアウト (KO) マウス、アンチセンス GH 遺伝子の導入により GH 発現を抑制したトランスジェニック (Tg) ラットは野生型に比べて長寿である¹⁷⁾。しかし、Ames 矮小マウス¹⁾ やアンチセンス GHTg ラット¹⁸⁾ では、CRによりさらに寿命が延長した。一方、GH 受容体/結合タンパク質 KO マウスではCRによる寿命延伸が認められなかった²⁾。これらの知見は、CRの効果はGH/IGF-1 依存的以外、非依存的なメカニズムによっても制御されていることを示唆する。

2. CRによる酸化ストレスの抑制

酸化ストレスは、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生の増加とそれに対する防御機構の低下により、増悪する。ROS は生体内において、ミトコンドリア電子伝達系を含む様々な反応により産生される。ミトコンドリア電子伝達系では複合体 I や III, IV において産生さ

れ、その中でも特に複合体 I の寄与が大きい。CR は複合体 I の活性をかなり選択的に抑制することが示され、この機構が CR によるミトコンドリア由来 ROS 産生の抑制の一因ではないかと考えられる⁶⁾。産生された ROS はカタラーゼなどいわゆるスカベンジャーエンザイムにより除去される。ミトコンドリア選択的にカタラーゼを過剰発現したマウスは、長寿となる¹⁶⁾。CR はカタラーゼや SOD の活性を増大、もしくは加齢に伴う活性の低下を抑制する¹⁹⁾。CR はこれらの反応を介して、酸化ストレスを抑制すると考えられる。

3. CR によるサーチュインの活性化

Sir2 (サーチュイン) は酵母の老化制御遺伝子として報告された。ほ乳類では SIRT1 から SIRT7 まで 7 つの Sir2 ホモログが存在する。現在まで、NAD 依存性脱アセチル化酵素活性を有する SIRT1 と 3、ADP リボシル化酵素活性を有する SIRT6 において、CR との関連が示されている¹¹⁾。

SIRT1 は CR により WAT や骨格筋において発現が亢進する。また、種々のタンパク質の脱アセチル化を介して、CR による DNA 安定性やストレス応答などを調節する可能性が示唆されている。しかしながら、肝臓においては、CR により発現はかえって減少し、肝特異的 Sirt1 KO マウスでは耐糖能が改善する。

SIRT3 は CR により WAT や褐色脂肪組織 (BAT)、肝臓において発現が上昇する。また、アセチル CoA の合成や β 酸化、ケトン体合成、還元型/酸化型グルタチオン比の増加を介した酸化ストレスに対する防御能の亢進にも関与する。

SIRT6 は CR により WAT や心臓、脳において発現が上昇する。また、NF- κ B やテロメアの安定化、poly (ADP-ribose) polymerase 1 などの活性化を通じて炎症や DNA 修復などに関与する。Sirt6 を過剰発現した雄マウスでは血中 IGF-1 濃度は低下し、寿命は延長する。

4. CR によるミトコンドリアバイオジェネシスの亢進

CR により、PPAR γ coactivator-1 α を介して、WAT や肝臓、心臓などでミトコンドリアバイオジェネシス (MtBio) の亢進が報告されている¹²⁾。しかしながら、近年、CR によるこの亢進に異を唱える論文が報告された⁷⁾。我々は 3 ヶ月齢より CR を開始した 9 ヶ月齢ラットの WAT や BAT、肝臓を解析し、CR は WAT では顕著に、肝臓では軽度で MtBio を亢進するものの、BAT では抑制することを明らかにした¹³⁾。また、WAT において MtBio に関する様々なバイオマーカーを経時的に解析したところ、CR の期間によってその影響が異なった。それゆえ、

CR による MtBio への影響は、臓器や組織により異なり、また CR の期間によっても異なるが、少なくとも WAT において長期間 (6 ヶ月以上) CR すると、MtBio が亢進することは明らかと思われる (未発表データ)。

5. CR における白色脂肪組織の重要性

WAT はアディポカインを分泌する内分泌組織である。アディポカインには、インシュリン感受性を正に制御し、炎症を抑制する善玉アディポカインであるアディポネクチンや、逆の作用を示す悪玉アディポカインである腫瘍壊死因子 α などがある¹⁵⁾。また WAT は生体内での脂質の合成と貯蔵、消費を調節する能力 (脂質に対する緩衝能) を有する。この WAT の脂質緩衝能が障害されると、脂質が非脂肪組織に蓄積され、全身性あるいは各臓器におけるインスリン抵抗性を惹起する¹⁵⁾。それゆえ、善玉アディポカインを多く分泌し、脂質緩衝能の高い脂肪組織が、生体にとって良い WAT である。

近年、WAT やアディポカインそのものが寿命制御に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。脂肪組織特異的インシュリン受容体 KO マウス¹⁷⁾ や脂肪細胞の分化に必須な転写因子である C/EBP α 遺伝子座に C/EBP β をノックインした C/EBP β/β マウス¹¹⁾、肝臓においてアディポネクチンの発現を亢進させた Tg マウス¹¹⁾ は長寿であり、前 2 者では WAT での MtBio が亢進している。加えて、野生型マウスでは内臓脂肪の外科的切除は生体にとって有益で、寿命を延長するが、長寿を示す GHR/BP KO マウスでの内臓脂肪の切除は、悪影響を及ぼすことが報告された¹⁰⁾。このことは、個体にとって良い WAT と悪い WAT があることを示している。

WAT が寿命制御に重要であること、CR の有益な効果には、GH/IGF1 シグナル依存性的および非依存性的なメカニズムがあることから、我々は、自由摂餌したアンチセンス GHTg ラットと野生型 CR ラットの WAT での遺伝子発現プロファイルを比較することで、CR の GH 非依存性メカニズムを探索した。その結果、CR は GH/IGF-1 非依存的に脂肪酸合成関連遺伝子の発現を誘導し、炎症関連遺伝子の発現を抑制した。また、前者は sterol regulatory element binding protein (SREBP) 1 により制御されていた⁵⁾。

6. CR における SREBP1c の重要性

SREBP は、脂質代謝における主要な転写因子で、SREBP1a、1c、2 の 3 つのアイソフォームが存在する。我々は WAT における主たるアイソフォームである SREBP1cKO マウスと野生型マウス各々に CR を行い、寿命をはじめとする様々なパラメーターを解析した。その結

果、野生型ではCRより寿命が延伸したが、KOではこのような効果が見られなかった。また、CRに伴って野生型で観察されるWATにおける脂肪酸合成関連タンパク質発現の亢進やMtBioの亢進、酸化ストレスの抑制などは、KOでは観察されなかった。以上より、SREBP1cが少なくともCRによるWATでの代謝のリモデリングを介して抗老化・寿命延伸効果の一端を担っている可能性が高い(未発表データ)。

7. CRにおける脂肪組織のリモデリングと脂質代謝の活性化

CRに伴う適応反応のうちWATでは、GH/IGF-1シグナル非依存的に炎症の抑制と脂肪酸合成系の活性化が観察された。また、後者はSREBP1cの活性化を介しており、MtBioの亢進と酸化ストレスの抑制を伴っていた。さらにサーチュインの活性化(SIRT1, SIRT3, SIRT6発現の増加)も観察される。このようなWATでの代謝のリモデリングは、悪玉に比し善玉アディポカイン優位な分泌を誘導し、脂質代謝を活発にする。CRはエネルギー源として脂質の利用を亢進させる⁶⁾。脂質利用の増加により、電子伝達系の複合体Iが迂回され、ROSの産生低下を介して酸化ストレスを低減する可能性も示唆される²¹⁾。

おわりに

我々は、CRの抗老化・寿命延伸メカニズムとして、GH/IGF-1非依存性のメカニズムの一つにはSREBP1cを介した脂肪組織リモデリングと脂質代謝の活性化が重要であろうと考えている。この考え方は、進化論的観点からHollidayが提唱した仮説を支持するものである。最後に第65回日本自律神経学会総会のシンポジウムにおいて講演の機会、さらにこの総説を執筆する機会を与えて下さった黒澤美枝子先生ならびに田村直俊先生に感謝致します。

文献

- 1) Bartke A, Wright JC, Mattison JA, et al. Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 2001; 414: 412.
- 2) Bonkowski MS, Rocha JS, Masternak MM, et al. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7901—7905.
- 3) Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, et al. Caloric restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E108—116.
- 4) Chiu CH, Lin WD, Huang SY, et al. Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev* 2004; 18: 1970—1975.
- 5) Chujo Y, Fujii N, Okita N, et al. Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration. *Age (Dordr)* 2013; 35: 1143—1156.
- 6) Guarente L. Mitochondria — a nexus for aging, caloric restriction, and sirtuins? *Cell* 2008; 132: 171—176.
- 7) Hancock CR, Han DH, Higashida K, et al. Does caloric restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *FASEB J* 2011; 25: 785—791.
- 8) Higami Y, Yamaza H, Shimokawa I. Laboratory findings of caloric restriction in rodents and primates. *Adv Clin Chem* 2005; 39: 211—237.
- 9) Holliday R. Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? *Bioessays* 1989; 10: 125—127.
- 10) Masternak MM, Bartke A, Wang F, et al. Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. *Aging Cell* 2012; 11: 73—81.
- 11) 道下(來生)江利子. サーチュインと老化. *基礎老化研究* 2013; 37: 1—6.
- 12) Nisoli E, Tonello C, Cardile A, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 2005; 310: 314—317.
- 13) Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, et al. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech Ageing Dev* 2012; 133: 255—266.
- 14) Otabe S, Yuan X, Fukutani T, et al. Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E210—218.
- 15) Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 85—97.
- 16) Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 2005; 308: 1909—1911.
- 17) Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, et al. Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. *Mol Cells* 2008; 26: 427—435.
- 18) Shimokawa I, Higami Y, Tsuchiya T, et al. Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. *FASEB J* 2003; 17: 1108—1109.
- 19) Yu BP. *Modulation of aging processes by dietary restriction*. CRC: Boca Raton: 1994.