

オステオカルシンが動脈硬化進展と次世代の生活習慣病発症に及ぼす影響

近藤, 皓彦

<https://doi.org/10.15017/1931830>

出版情報 : Kyushu University, 2017, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

オステオカルシンが
動脈硬化進展と次世代の生活習慣病発症に及ぼす影響

2018年3月

九州大学大学院歯学府 歯学専攻
口腔常態制御学講座
口腔細胞工学分野

近藤 皓彦

九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター
九州大学大学院歯学研究院 口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野

研究指導者 自見 英治郎 教授

対 象 論 文

本論文の一部は下記の原著論文として発表した。

Akihiko Kondo, Tomoyo Kawakubo-Yasukochi, Akiko Mizokami, Sakura Chishaki,
Hiroshi Takeuchi, Masato Hirata

Uncarboxylated osteocalcin increases serum nitric oxide levels and ameliorates
hypercholesterolemia in mice fed an atherogenic diet

Electronic Journal of Biology 13: 22-28, 2017

Tomoyo Kawakubo-Yasukochi, Akihiko Kondo, Akiko Mizokami, Yoshikazu Hayashi,
Sakura Chishaki, Seiji Nakamura, Hiroshi Takeuchi, Masato Hirata

Maternal oral administration of osteocalcin protects offspring from metabolic
impairment in adulthood

Obesity 24: 895-907, 2016

略語一覧

ABCA1 : ATP 結合カセット輸送体サブファミリーA1 (ATP-binding cassette transporter subfamily A member 1)

ABCG5 : ATP 結合カセット輸送体サブファミリーG5 (ATP-binding cassette transporter subfamily G member 5)

ABCG8 : ATP 結合カセット輸送体サブファミリーG8 (ATP-binding cassette transporter subfamily G member 8)

CLS : 王冠様構造 (Crown-like structure)

DOHaD : Developmental Origins of Health and Disease

eNOS : 内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase)

GLP-1 : グルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1)

Gprc6a : G 蛋白質共役型受容体ファミリーC グループ 6a (G protein-coupled receptor family C group 6 member A)

HAEC : 正常ヒト大動脈血管内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells)

HDL-C : 高比重リポ蛋白質コレステロール (high density lipoprotein cholesterol)

IL-6 : インターロイキン-6 (Interleukin-6)

IL-10 : インターロイキン-10 (Interleukin-10)

LDL-C : 低比重リポ蛋白質コレステロール (low density lipoprotein cholesterol)

LXR α : 肝臓 X 受容体 α (liver X receptor α)

MCP-1 : 単球走化性蛋白質-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

NO : 一酸化窒素 (nitric oxide)

OC : オステオカルシン (osteocalcin)

PCR : ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

SREBP : ステロール調節配列結合蛋白質 (sterol regulatory element-binding protein)

TG : 中性脂肪 (triglyceride)

T-CHO : 総コレステロール (Total cholesterol)

TNF- α : 腫瘍壊死因子- α (Tumor necrosis factor- α)

目 次

要 旨	1
緒 言	3
第一章	4
材料と方法	5
結 果	9
考 察	19
第二章	22
材料と方法	23
結 果	25
考 察	44
総 括	46
謝 辞	47
参考文献	48

要 旨

オステオカルシン(osteocalcin, OC)は骨芽細胞から分泌される分子量約 5,900 の非コラーゲン性骨基質タンパク質である。分子内の 3 つのグルタミン酸残基の γ -カルボキシル化状態によって、GlaOC(全てカルボキシル化)と GluOC(非(低)カルボキシル化)に分けられる。OC の大部分は GlaOC としてヒドロキシアパタイトと結合して骨基質中に局在するが、一部は骨リモデリングの過程で溶出し、GlaOC あるいは GluOC として血液中を循環している。

近年、OC が生体内でホルモン作用によって、糖脂質代謝の改善作用を発揮するという報告がなされた。本研究では、視点を変えた OC の役割について検討した。始めに動脈硬化の進展に関わる影響について血管内皮細胞およびマウスを用いて検討した(第一章)。次いで、妊娠中の母体に OC を投与して生まれた仔の生活習慣病発症への影響について検討した(第二章)。

第一章では、動脈硬化誘発飼料で飼育した雌マウスに対して、GluOC の腹腔内投与を行った。その結果、GluOC 投与群では、総コレステロール値、LDL-C、および LDL-C/HDL-C 比に顕著な改善が認められた。また、GluOC 投与群の肝臓と脂肪組織において、コレステロール代謝に関わる核内受容体 LXR α (Liver X receptor α) およびその下流遺伝子の発現量が有意に上昇していた。さらに、GluOC 投与群では、血清中 NO (nitric oxide) 濃度が上昇した。この機序を解析するために、正常ヒト大動脈血管内皮細胞に GluOC を添加したところ、eNOS (endothelial NO synthase) のリン酸化が亢進し、NO 産生が上昇した。なお、GlaOC は無効であった。以上より、GluOC は、少なくとも eNOS/NO を介して動脈硬化抑制作用を発揮することが示唆された。

第二章では、栄養状態の異なる妊娠母体が摂取した GluOC の次世代生活習慣病発症に対する影響を解析した。妊娠マウスを普通食(ND)摂取群と高脂肪食(HFD)摂取群とに分け、それぞれの群に対して、生理食塩水あるいは GluOC を妊娠期間中、毎日経口投与した。出産後 24 日で離乳させた仔マウスは、以後さらに ND 摂取群と HFD 摂取群とに分けて群飼育を行い、雌雄別に解析した。妊娠母体の HFD 摂取は、仔自身が ND を摂っていれば特に顕著な影響を及ぼさなかったが、仔が HFD を摂取した場合には、肥満やインスリン抵抗性、耐糖能低下を誘導することが示唆された。また、これらの現象は、母親が妊娠中に GluOC を摂取することで改善した。餌や

GluOC への感受性には雌雄差が認められた。以上の結果は妊娠母体の過栄養が仔に与える負の影響は、GluOC を摂取することで回避された。このことから、妊娠母体の栄養状態が仔の代謝に大きく影響を与えること、また、GluOC が世代を超えた糖脂質代謝改善作用を発揮することが明らかとなった。

緒 言

近年、糖脂質代謝と骨代謝に共通して関与する因子の存在が明らかとなり、生活習慣病と骨代謝との連関が注目されている(1)。

そのような状況下で、骨芽細胞から産生・分泌される OC が、エネルギー代謝に重要な役割を担っていることを示す研究結果が 2007 年に報告された(1)。その後、特に GluOC の内分泌因子としての可能性について、数多くの報告がなされ(1-4)、骨が、単に体を支えるための組織としてだけでなく、内分泌器官として機能していることが実証されている。

現在までに、様々な病態における OC の血中濃度の臨床データが報告されている(5-7)。特に、血清中 OC と動脈硬化症の進展が負の相関をもつことが、複数の研究グループから報告されている(5、8)が、その具体的なメカニズムは明らかとなっていない。さらに、これらの解析はすべて血中総 OC 濃度を指標とした観察研究が主であり、動脈硬化の病態における GluOC あるいは GlaOC 単独の役割を示す研究結果は報告されていない。

動脈硬化は、複数の因子が複雑に関与して進行するが、発症の初期段階には必ず血管内皮の機能障害が認められており(9-10)、その要因として、NO 不活性化が重要視されている(11-12)。そこで本研究の第一章では、動脈硬化発症における GluOC あるいは GlaOC の役割について、NO に着目した解析を行った。*In vitro* ではヒト大動脈血管内皮細胞を用いた実験系で、GluOC あるいは GlaOC 存在下での NO 産生誘導の程度を観察した。また、*in vivo* では、動脈硬化誘発飼料で飼育した野生型マウスを用いて、GluOC 投与が動脈硬化改善に寄与する可能性を提示した。

一方、生活習慣病の発症素因が胎児期の栄養状態によって決定されるという「生活習慣病胎児期起源説」が提起され、妊娠母体の栄養状態が世代を越えた生活習慣病人口を増加させることが明らかとなっている(13-16)。

GluOC は胎盤通過性をもつことが報告されていることから(17)、第二章では、妊娠母体が摂取する GluOC が胎児の将来の生活習慣病発症リスクに及ぼす影響について、マウスを用いた解析を行った。

第一章

GluOC の抗動脈硬化作用

材料と方法

GluOC、GlaOC の調製

GluOC は、過去の報告(2)に基づき、下記の方法に従って随時調製した。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を結合させた GluOC の発現ベクターは、pGEX-4T-1 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) にマウス OC の cDNA を挿入して作製した。タンパクは大腸菌で産生し、グルタチオンセファロースビーズ(GE Healthcare)を用いて精製した。エンドキシンを除去するために 0.1% Triton X-114 を添加したバッファーで洗浄した後に、GST をトロンビンを用いて切断し、ベンザミジンセファロースカラム (GE Healthcare) に通して除去した。GluOC の純度は、トリス-トリシンバッファーを用いたドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、クーマシーブルーリリアントブルー染色で確認した。濃度はマウス GluOC の EIA あるいは ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) キット(タカラバイオ、滋賀)によって測定した。

GlaOC はヒト型のものを AnaSpec (Fremont, CA) より入手した。

細胞培養

正常ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) は Promocell (Heidelberg, Germany) から購入した。HAEC の培養は、内皮細胞増殖培地 MV2 (Endothelial Cell Growth Medium MV2) (Heidelberg, Germany) を用いた。細胞は、5% CO₂、37°C にて培養した。

ウエスタンブロッティング

培養細胞にプロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク、京都)およびホスファターゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)を添加した RIPA Buffer (ナカライテスク) を加え、セルスクレーパーで回収後、4°C、15000 × g にて 30 分間遠心し、その上清を細胞溶解液とした。

タンパク定量は BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて行い、その後、サンプルバッファー (0.1 M Tris、2% SDS、5% glycerol、2.5% 2-mercaptoethanol、0.05% bromophenol blue) で、20 µg/ lane となるように調製した。サンプルは、5 分間煮沸し、SuperSep™ Ace、5-20% (Wako Pure Chemical Industries、大阪) を用いて分離し、ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF; polyvinylidene difluoride membrane、Merck-Millipore Darmstadt, Germany) に転写した。転写膜は、ブロッッキングワウン(ナカライテスク)にて室温で 1 時間ブロッッキングを行った後、一次抗体として抗 eNOS 抗体 (1:1000; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 、抗 p-eNOS 抗体 (1:

1000; BD Biosciences)、抗 liver X receptor α (LXR α) 抗体(1:1000; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)、抗 sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2)抗体(1:3000; MBL Co., Ltd., 名古屋)、抗 β -actin 抗体(1:3000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、抗 GAPDH 抗体(1:40000; Biosource International, Camarillo, CA) と 4°Cで一晩反応させた。続いて、0.1% Tween 20 含有トリス緩衝生理食塩水(TBS-T)で洗浄をした後、二次抗体である anti-mouse あるいは anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA)と 4°Cで 5 時間反応させた。

PVDF 膜を TBS-T で洗浄後、発色試薬として Chemiluminescence Substrate Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, PA)、あるいは SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)を用い、LAS-4000 (GE Healthcare)にて、目的タンパク質の検出を行った。

また、検出されたバンドの濃さの測定は、ImageJ Software (18) によった。

動物実験

すべての動物実験は、九州大学動物実験規則および指針に従い、動物愛護および動物福祉の観点から適正な実験計画の下に行った。飼育および実験は、恒温(23°C)・恒湿(50±5%)の SPF 環境下、12 時間ごとの明暗サイクルの飼育環境下で行った。

通常飼料(CRF-1)および動脈硬化誘発飼料(F2HFD1)はオリエント酵母工業株式会社(東京)より購入した。F2HFD1 は、基礎飼料 CRF-1 (72%)と、その他含有物(28%)で配合されており、以下にその他含有物の組成を示す。

カカオバター	7.5%
コール酸	0.5%
セルロース	1.25%
ミネラル	1.0%
グルコース	1.625%
塩化コリン	0.125%
コレステロール	1.25%
カゼイン	7.5%
ビタミン	1.0%
スクロース	1.625%
デキストリン	1.625%
ラード	3.0%

動脈硬化誘発実験

C57BL/6N 野生型雌マウスに対して、8 週齢より 18 週齢まで計 10 週間、F2HFD1 を継続的に給餌した。また、その間、週 5 回 GluOC (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) の腹腔内投与を行った。対照群には、同量の生理食塩水の腹腔内投与を行った。マウスの体重は 7 日毎に測定した。18 週齢にて安楽死させ、解析を行った。

血清脂質測定

血清中総コレステロール値、LDL コレステロール値 HDL コレステロール値、LDL/HDL 比、中性脂肪値の項目については、長浜バイオラボラトリー(滋賀)に検査を委託した。

組織学的解析

性腺周囲脂肪組織と肝臓組織は 4%PFA での固定後、パラフィン包埋切片のヘマトキシリン・エオシン(HE)染色を行った。染色後、脂肪細胞の脂肪滴の面積、肝臓の脂質部分の面積を計測し、BIOREVO BZ-9000 および BZ-Analyzer-II Software (Keyence、大阪)を用いて定量比較した。

血清中の一酸化窒素(NO)測定

マウスの採血は、安楽死を行った直後に、心穿刺により行った。その後、遠心分離により、血清を回収した。回収した血清は Ultracel-10 membrane (Merck Millipore, Billerica MA)を用いて、タンパク除去を行い、これを測定検体とした。NO 濃度は、NO₂/NO₃ Assay Kit-Fx (DOJINDO、熊本)を用い、NO₂⁻と 2,3-Diaminonaphthalene との反応を利用して、検体中の NO を蛍光法で間接的に測定することで算出した。蛍光測定にはマイクロプレートリーダー(Perkin Elmer) ARVOX4 を使用した。

定量 RT-PCR 法

Sepasol-RNA I super G (ナカライテスク)と High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて、安楽死後のマウスから摘出した肝臓、脂肪、小腸の各組織より、全 RNA を抽出した。全 RNA 量を揃え(1 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ / reaction)、ReverTra Ace Kit (東洋紡、大阪)を用いて逆転写した。得られた cDNA について、LightCycler® 480 system (Roche Diagnostics) を用いて、TaqMan プローブ法によって遺伝子増幅、測定を行った。すべての遺伝子の PCR 反応において、アニーリング温度は 60°Cとした。使用したプローブ(Universal Probe Library, Roche Diagnostics)、プライマー、増幅産物の大きさを(表1)に示す。

統計解析

すべてのデータは平均±標準誤差で表し、ステューデント t 検定にて統計学的解析を行った。また、5%水準で有意差があると判定した。

結 果

(1) GluOC および GlaOC が血管内皮細胞の NO 産生機構に及ぼす影響

はじめに、GluOC および GlaOC が、血管内皮細胞の NO 産生機構に及ぼす影響について調べるために、正常ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を用いて、NO 合成酵素である eNOS(endothelial NO synthase)のリン酸化に着目した解析を行った。

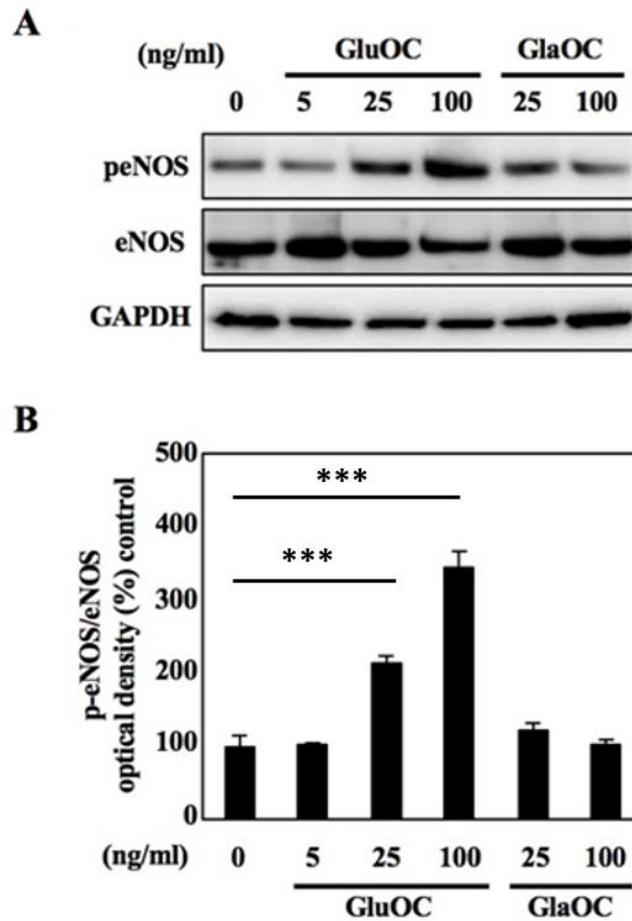
各濃度の GluOC および GlaOC を HAEC 細胞の培養上清に添加し、30 分後の HAEC 細胞における eNOS のリン酸化状態について、ウエスタンブロッティングで解析した。

低濃度(5 ng/ml)の GluOC では、eNOS のリン酸化レベルに変化は認められなかったが、25 ng/ml および 100 ng/ml の GluOC 添加では、濃度依存的に eNOS のリン酸化が亢進していた(図 1A、1B)。

一方、GlaOC の添加では、eNOS のリン酸化レベルに変化は認められなかった(図 1A、1B)。

なお、GluOC あるいは GlaOC の処理による eNOS の発現量の変動は観察されなかった。

このことから、HAEC 細胞において、GluOC は、eNOS のリン酸化を誘導し、NO 産生を促進させる作用をもつことが示唆された。また、GlaOC が eNOS のリン酸化を介した NO 産生促進作用をもたないことが明らかとなった。



(図1) GluOCあるいはGlaOC添加時のHAEC細胞におけるeNOSのリン酸化レベル

HAEC細胞に対して、各濃度のGluOCあるいはGlaOCを30分間添加した後のeNOSおよびpeNOSの発現レベルをウエスタンブロッティングにより調べた(A)。内部標準タンパク質として、GAPDHを用いた。

(B)には、(A)における各バンドの濃さを定量化して比較解析したグラフを示す。グラフは3回の実験の平均値±標準誤差で表した。*** $P < 0.001$ 。

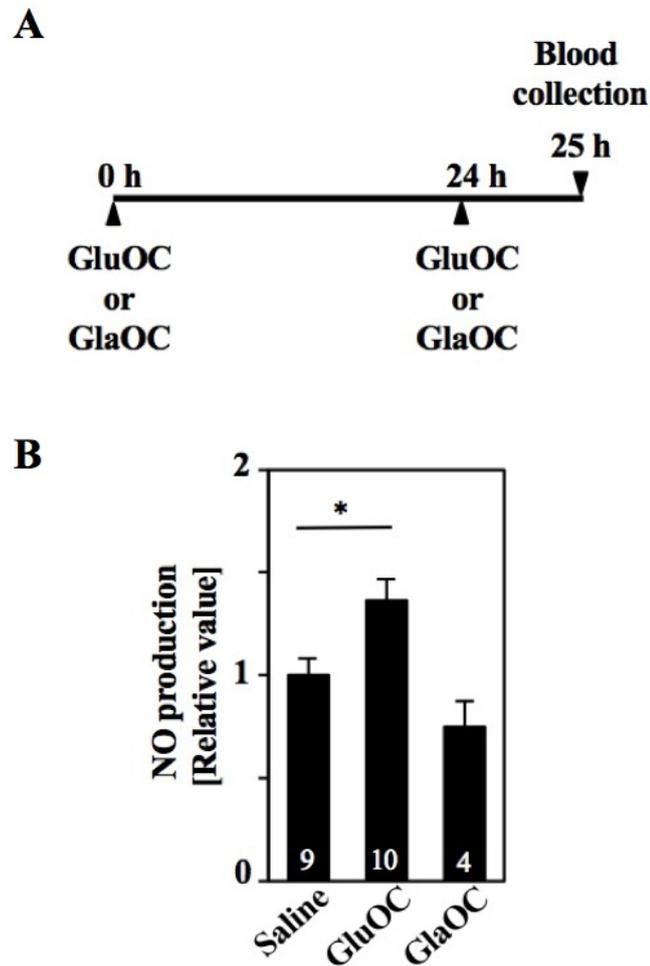
(2) GluOC および GlaOC の腹腔内投与が血中 NO 濃度に及ぼす影響

次に、*in vivo*における GluOC および GlaOC の NO 産生作用を調べるために、マウスを用いた実験を行った。

8 週齢の C57BL/6N 野生型雌マウスに 24 時間間隔で 2 回 GluOC あるいは GlaOC (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) を腹腔内投与し、2 回目の投与から 1 時間経過後の血清 NO 濃度を測定した(図 2A)。

その結果、GluOC を投与したマウスでは、対照群に比べて、血清 NO 濃度が、約 1.4 倍上昇していた(図 2B)。また、GlaOC を投与したマウスでは、血清 NO 濃度に変化は認められなかった(図 2B)。

これらの結果から、*in vitro*のみならず、*in vivo*においても GluOC が一過性の NO 産生作用をもつことが示された。また、GlaOC は *in vivo*においても、NO 産生促進作用をもたないことが明らかとなった。



(図 2) *In vivo*における GlaOC、GluOC の NO 産生能

(A) GluOC および GlaOC の投与スケジュールを示す。8 週齢 C57BL/6N 野生型雌マウスに 24 時間間隔で 2 回の GluOC あるいは GlaOC (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight)、また、対照群には生理食塩水を腹腔内投与し、2 回目の投与から 1 時間後の血清 NO 濃度の測定を行い、比較解析した (B)。

グラフは、対照群の計測値を 1 としたときの相対値について、平均値 \pm 標準誤差で表記した。また、棒グラフ内の数字は、動物の n 数を示す。実験は 3 回行い、同様の結果が得られた。* $P < 0.05$ 。

(3) In vivo における GluOC の動脈硬化抑制効果の検討

NO は、血管拡張作用、血小板凝集抑制作用、細胞接着因子の発現制御などの複数の機構を介して、動脈硬化を抑制する働きをもつことが知られている(9-11)。

そこで、前述の GluOC による NO 産生促進効果が、動脈硬化発症抑制に寄与する可能性をしらべるために、生後 8 週齢から 10 週間、動脈硬化誘発飼料(F2HFD1)で飼育したマウスに対して、GluOC(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight、週 5 回)の長期投与実験を行った(図 3A)。

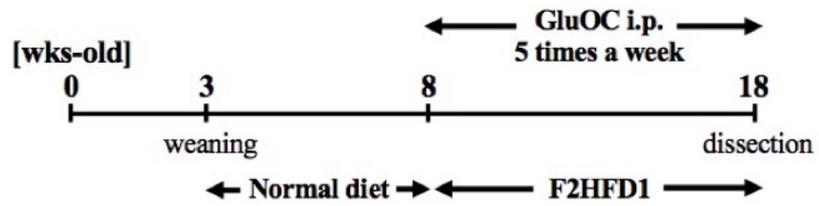
GluOC 投与群と対照群の間で、体重に有意な差は認められなかった(図 3B)。また、実験開始から 10 週間後の血清 NO 濃度は、対照群に比べ、GluOC 投与群で約 1.7 倍上昇していた(図 3C)。これは、GluOC の *in vivo* における NO 産生促進作用が、GluOC を長期間投与した場合にも発揮されていたことを示唆すると考えられる。

さらに、血液生化学的検査では、GluOC 投与群では、対照群に比べて、総コレステロール値(T-CHO)、LDL コレステロール値(LDL-C)が低下し、動脈硬化進展の指標となる LH 比(LDL/HDL)(19-20)に改善が認められた(図 3D、E、F)。なお、中性脂肪値(TG)、HDL コレステロール値(HDL-C)は変化が認められなかった(図 3G、H)。

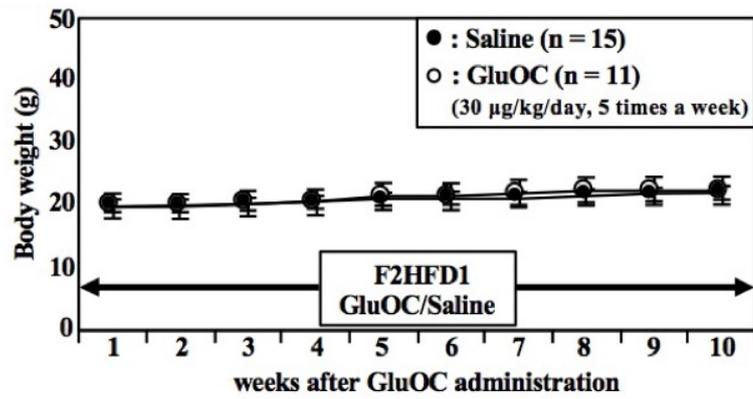
続いて、脂肪組織と肝臓に着目して組織学的解析を行った。その結果、GluOC 投与により、脂肪細胞が小型化し、肝臓組織内へ脂肪滴の集積が抑制されていた(図 3I、J)。

これらの結果から、GluOC は長期間投与を行った場合にも、NO 産生促進作用が認められ、抗動脈硬化作用をもつ可能性が提示された。また、GluOC を投与したマウスでは、血清脂質値や肝臓組織への脂肪沈着の改善、脂肪細胞の小型化が認められたことから、GluOC が、動脈硬化症の危険因子とされている脂質異常症の改善にも寄与していたことが推察された。

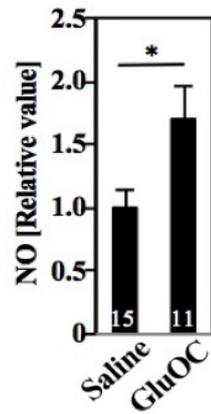
A

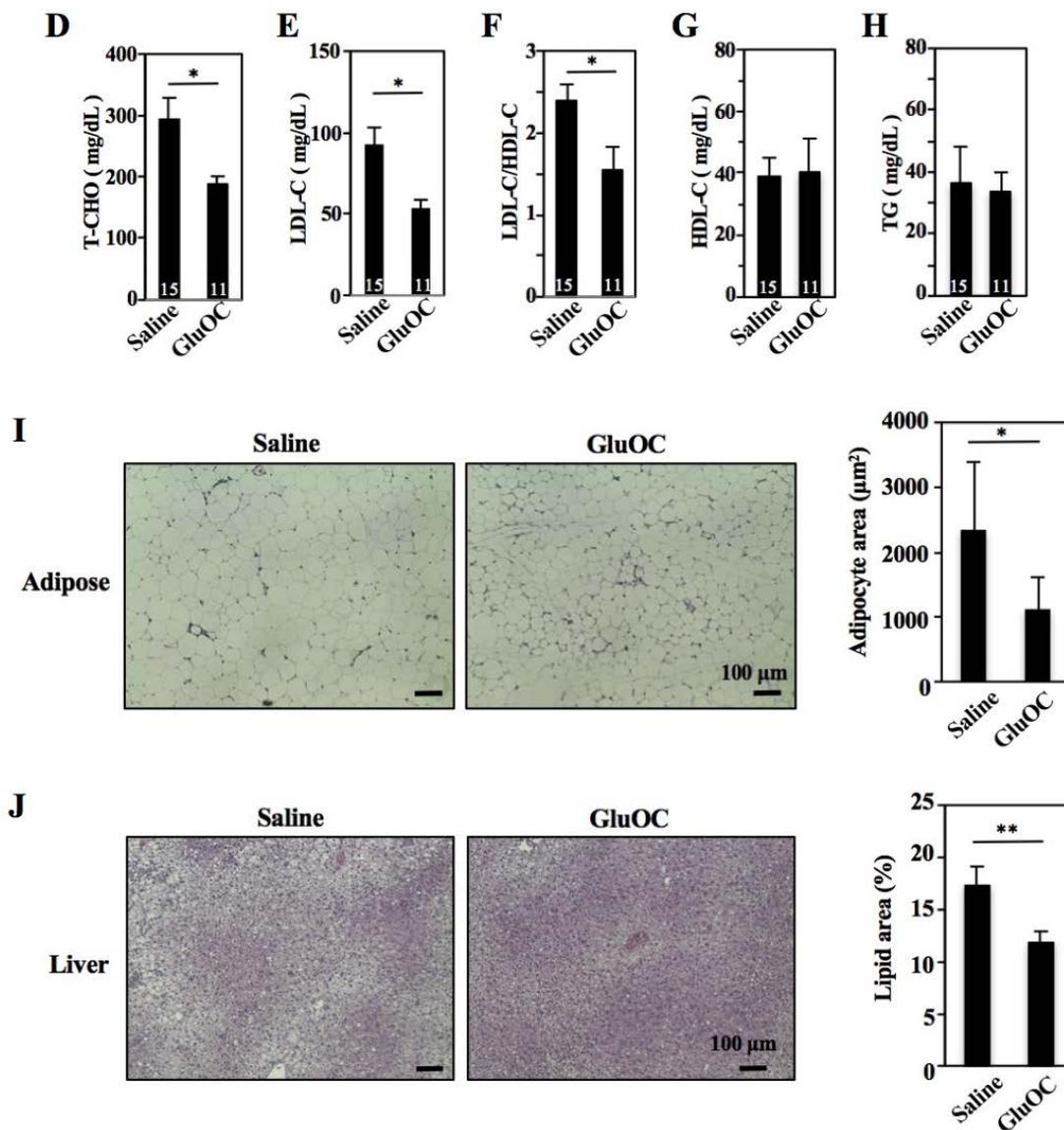


B



C





(図 3) GluOC による抗動脈硬化作用

(A) 実験スケジュールを示す。C57BL/6N 野生型雌マウスを離乳から 8 週齢になるまで、普通食で飼育した。生後 8 週齢から 10 週間、動脈硬化誘発飼料 (F2HFD1) を給餌し、GluOC (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) あるいは生理食塩水の腹腔内投与を週 5 回行った。(B) はマウス体重を示す。また、生後 18 週齢でのマウス血清 NO 濃度 (C)、総コレステロール値 (D)、LDL コレステロール値 (E)、LDL/HDL 比 (F)、HDL コレステロール値 (G)、中性脂肪値 (H) を平均値 \pm 標準誤差で表記した。棒グラフ内の数字は、動物の n 数を示す。生後 18 週齢で解剖後、性腺周囲白色脂肪組織における脂肪細胞の面積 (I)、および肝臓における脂肪滴の面積 (J) を計測し、対照群と比較した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

(4) 脂質代謝に対する GluOC の影響

図 3 の結果をふまえて、GluOC による血清脂質値の改善が如何なるメカニズムを介しているのか調べる目的で、GluOC 長期投与を行ったマウス(図 3A)の小腸、脂肪組織、肝臓における脂質代謝制御関連分子の発現について、解析を行った。

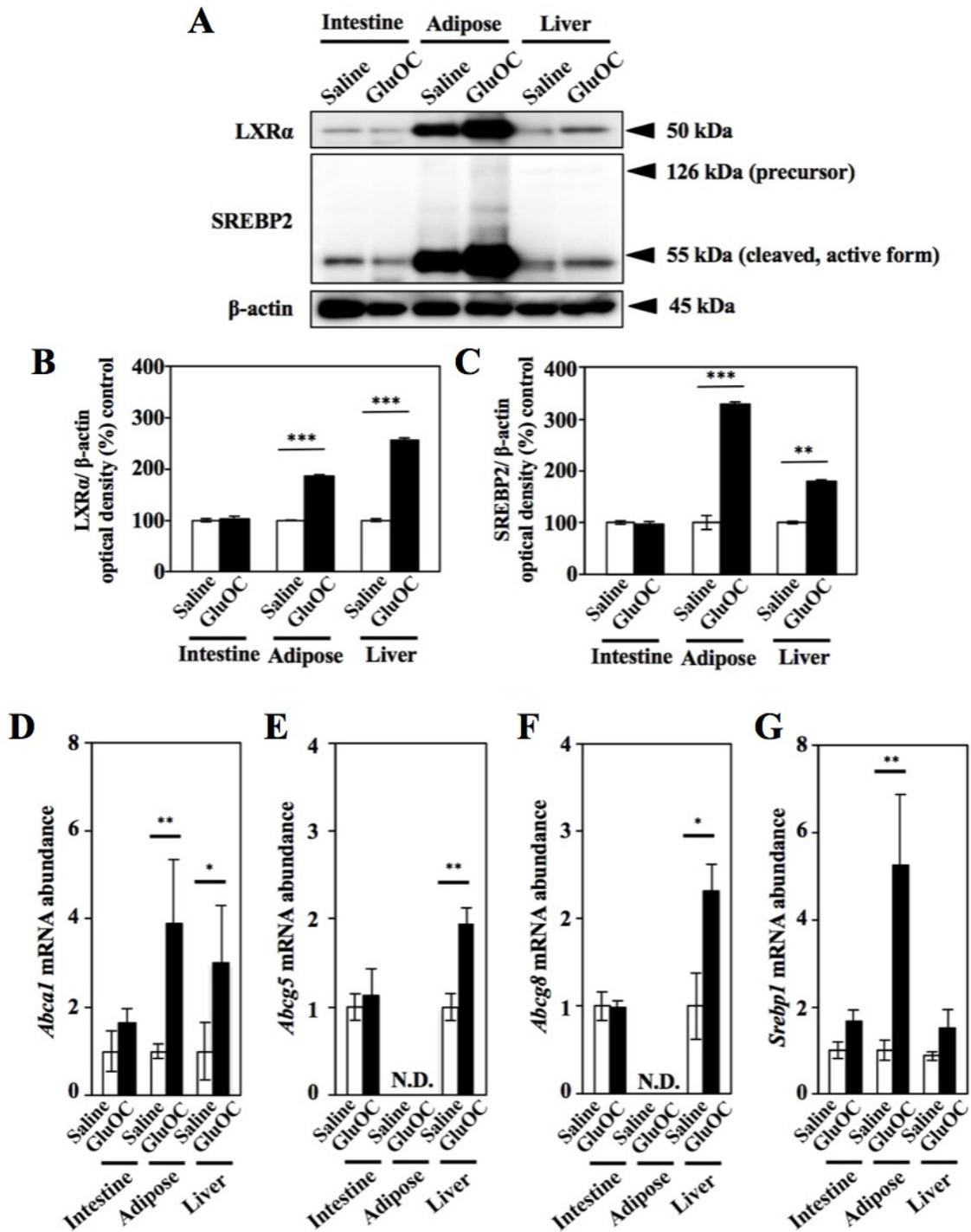
ウエスタンブロッティングの結果、コレステロール代謝に関わる転写因子である SREBP2(21-22)と LXR α (23-24)については、GluOC を投与したマウスの脂肪組織と肝臓において、発現が上昇し、それぞれ活性型の分子量として検出された(図 4A)。しかし、同一個体でも、小腸でのそれら転写因子の発現は、GluOC 投与の有無に影響を受けなかった(図 4A、B、C)。

次に、定量 RT-PCR(表 1)にて、LXR α の標的遺伝子である *Abca1* (23-25)、*Abcg5* (24、26)、*Abcg8* (24、26)、*Srebp1* (23-24、27) の発現解析を行ったところ、コレステロールトランスポーターである *Abcg5*、*Abcg8* が肝臓において(図 4E、F)、また、*Abca1* は肝臓と脂肪組織において(図 4D)、GluOC 投与による発現上昇が認められた。

また、GluOC 投与マウスの脂肪組織では、脂肪酸合成のマスターレギュレーターである *Srebp1* の発現量が、対照群に比べて有意に上昇した(図 4G)。

Gene	Direction	Primer sequence	Base pairs	Probe No.
<i>β-actin</i>	Forward	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	104 bp	64
	Reverse	ACCAGAGGCATACAGGGACA		
<i>Abca1</i>	Forward	GCAGATCAAGCATCCCAACT	69 bp	1
	Reverse	CCAGAGAATGTTTCATTGTCCA		
<i>Abcg5</i>	Forward	TCCTGCATGTGTCCTACAGC	85 bp	31
	Reverse	ATTTGCCTGTCCCACTTCTG		
<i>Abcg8</i>	Forward	AACCCTGCGGACTTCTACG	94 bp	10
	Reverse	CTGCAAGAGACTGTGCCTTCT		
<i>Srebp1</i>	Forward	TCAAGCAGGAGAACCTGACC	111 bp	25
	Reverse	TCATGCCCTCCATAGACACA		

(表 1) 定量 RT-PCR に用いたプローブおよびプライマーと増幅産物の大きさ



(図4) GluOCによる脂質代謝制御因子の発現変動

(A) (図3)と同条件で実験を行ったマウスの小腸、脂肪、および肝臓の各組織について、GluOC投与群と対照群でのLXR α とSREBP2の発現比較をウェスタンブロッティングにて行った。(B)(C)に、各バンドの濃さを定量化して比較解析したグラフを示す。また、同組織における*Abca1*(D)、*Abcg5*(E)、*Abcg8*(F)、*Srebp1*(G)の発現比較を定量RT-PCRにて行った。グラフは、対照群の計測値を100%あるいは1としたときの相対値について、平均値±標準誤差で表記した。実験は3回行い、同様の結果が得られた。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

考 察

本章では GluOC および GlaOC の動脈硬化の病態に対する影響について調べるために、ヒト正常大動脈由来の血管内皮細胞を用いた *in vitro* の系と、動脈硬化誘発飼料を給餌した C57BL/6N 野生型マウスを用いた *in vivo* の系で実験を行った。

解析の結果、GluOC が、① NO 産生促進作用、および ② 脂質異常症の改善作用を有しており、これらのメカニズムを介して動脈硬化の進展を抑制している可能性を提示した。

① NO 産生促進作用 について

GluOC は単回投与のみならず、長期投与の場合でも、マウスの血中 NO 濃度を上昇させた。

NO は、様々な組織や臓器において多彩な作用を発揮し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている(28)。特に、動脈硬化の側面から NO の存在意義を鑑みる場合、NO は、血管拡張作用、血小板凝集抑制作用等、多彩な動脈硬化抑制効果をもつ魅力的な分子であるといえる(9-11)。

NO は、神経型、誘導型、内皮型の 3 種類の NO 合成酵素アイソフォームから産生されることが知られているが(29)、なかでも内皮型 NO 合成酵素である eNOS は血管内皮に恒常的に発現している(29)。

本研究では、GluOC が、血管内皮細胞に直接働き、eNOS のリン酸化を亢進させることで、NO 合成を促進している可能性が示された。

近年、eNOS のリン酸化を誘導する分子が次々に報告されている。その中でも、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインのひとつであるアディポネクチンが、eNOS のリン酸化を促進することが明らかとなっている(30)。GluOC が、脂肪細胞において、アディポネクチンの産生を促進させることもすでに報告されていることから(4)、今回の *in vivo* での長期 GluOC 投与実験で得られた NO 産生亢進作用は、GluOC の血管内皮細胞への直接的作用のみならず、アディポネクチンの発現増強を介した間接的作用の存在が寄与していた可能性も考えられた。

なお、GlaOC には、*in vitro* での eNOS リン酸化作用や、*in vivo* での血中 NO 濃度増加効果は認められなかった。

② 脂質異常症の改善作用について

脂質異常症は、心血管疾患や動脈硬化の発症や進展に関わるリスクファクターである(11、12)。

今回、動脈硬化誘発飼料を与えたマウスを用いた *in vivo* 実験において、GluOC 長期投与による高コレステロール血症の改善が認められた。

そのメカニズムの解析では、GluOC 投与によって、コレステロール代謝調節を行う転写因子である LXR α の発現上昇 が肝臓と脂肪組織において認められた。

LXR α は酸化コレステロールをリガンドとして活性化される受容体である(14)。GluOC 投与による LXR α の発現上昇が、細胞内酸化コレステロールの増加によるものなのか、あるいは、なんらかの機序を介した GluOC の LXR α 発現制御であるのかは不明であるが、GluOC を長期投与したマウスでは、対照群に比べ、肝臓組織において ATP 結合カセット輸送体 (ATP-binding cassette transporters) である *Abca1*、*Abcg5*、*Abcg8* (23-26) の mRNA 発現が上昇していた。これら遺伝子の発現上昇は、いずれも LXR α に発現調節を受けた結果生じた現象と捉えることができる(23-25)。

ABCG5/8 はヘテロダイマーを形成し、コレステロールトランスポーターとして機能し、小腸上皮細胞から小腸内腔へ、肝細胞から胆汁へのコレステロール排出に関与している(16)。つまり、GluOC は、ABCG5/8 の発現を亢進させることで、肝臓から体外へのコレステロール排泄を促進させる働きを誘導することが示唆された。

また、ABCA1 は、細胞内からリン脂質とコレステロールを輸送し、細胞外ドメインに結合するアポリポプロテイン A-I と HDL 粒子を形成する(23、25)。その遺伝子異常が HDL 欠損症の原因となることが報告されている(23)ことから、HDL の形成に非常に重要な役割を担っている分子である。

今回の実験において、GluOC 投与群と対照群との間に、HDL コレステロール濃度の有意な差は認められなかった。しかし、最近の脂質異常症の診断では、LDL、HDL の個々の数値ではなく LH 比が重視されている(19-20)ことから、今回の実験において GluOC 投与群で脂質代謝異常が改善されていたことは明白といえる。

一方、GluOC 投与によって、脂質代謝制御因子の発現制御を行うもうひとつの転写因子である SREBP2 の発現上昇 も肝臓と脂肪組織において認められた。

SREBP には、主に脂肪酸合成経路の酵素遺伝子を制御する SREBP1 と、コレステロール合成経路の酵素遺伝子の発現を制御する SREBP2 とが存在する(22、

24、27)。

SREBP2 は、それ自身が SREBP 応答遺伝子であり(22)、細胞内コレステロール量が低下すると、それに伴い SREBP2 の発現が活性化される。今回、GluOC 投与マウスの肝臓と脂肪組織において、活性型 SREBP2 の発現亢進が認められた。この結果は、過去の報告(26)にあるように、ABC トランスポーターの発現上昇に続くコレステロール排出亢進に対して、代償的なコレステロール合成の上昇が生じていた可能性を示唆するかもしれない。

SREBP1 もまた、SREBP による自己転写制御を受けているが、SREBP2 と異なり、同時に LXR α の転写制御も受けていることが報告されている(24、27)。これは、SREBP1 発現が上昇することで、脂肪酸合成が亢進し、遊離コレステロールをエステル型コレステロールにすることで無毒化していると捉えることもできる。

今回、GluOC 投与群の脂肪組織では、*Srebp1* の mRNA 発現量が上昇していたが、この結果もまた、LXR α の活性化によるものと考えられた。

以上のことから、本章では、GluOC が ①NO 産生促進作用、②脂質異常症の改善作用を有していること、さらに、肝臓での脂肪滴縮小や、脂肪細胞の小型化など、個体レベルでの脂質代謝改善作用をもつことを証明し、GluOC が抗動脈硬化効果をもつ可能性を提示した。

なお、今回の野生型マウスを用いた実験では、いずれの群においても、動脈硬化巣の形成を確認できなかったため、今後、動脈硬化感受性の高い Apolipoprotein E 欠損マウス等の遺伝子改変動物を用いての検証実験が必要であると思われる(31-32)。

第二章

妊娠母体が摂取した GluOC が
次世代の糖脂質代謝に及ぼす影響

材料と方法

動物実験

すべての動物実験は、九州大学動物実験規則および指針に従い、動物愛護および動物福祉の観点から適正な実験計画の下に行った。飼育および実験は、恒温(23°C)・恒湿(50±5%)の SPF 環境下、12 時間ごとの明暗サイクルの飼育環境下で行った。1 ケージ当たり3もしくは4 匹にて群飼育を行った。

飼料は、普通食(CRF-1)および、CRF-1 を基礎とした高脂肪高シヨ糖食(HFS; オリエント酵母工業株式会社 F2HFHSD; シヨ糖 20%, 脂肪含量 30%)を用いた。配合成分については、下記に組成を示す。

カゼイン	25.0%
α 化コーンスターチ	14.869%
シュークロース	20.0%
牛脂	14.0%
ラード	14.0%
大豆油	2.0%
セルロースパウダー	5.0%
AIN-93 ビタミン混合	1.0%
AIN-93G ミネラル混合	3.5%
重酒石酸コリン	0.25%
第三ブチルヒドロキノン	0.006%
L-シスチン	0.375%

血清脂質測定

血清中総コレステロール値、LDL コレステロール値 HDL コレステロール値、中性脂肪値の項目については、長浜バイオラボラトリー(滋賀)に検査を委託した。

ブドウ糖負荷試験

21 時間絶食させたマウスに、グルコース(1.5 g/kg body weight)の腹腔内投与を行い、0、15、30、60、120 分経過後に、尾から採血し、血中グルコース濃度と、血中インスリン濃度を測定した。グルコース濃度は FreeStyle Freedom monitoring system (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)、インスリン濃度は ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden)を用いて測定した。

インスリン負荷試験

4 時間絶食させたマウスに、インスリン (Humulin (Eli Lilly, Indianapolis, IN)); 普通食摂取マウスに対して 0.5 U/ kg body weight、高脂肪高シヨ糖食摂取マウスに対して 1.2 U/ kg body weight) の腹腔内投与を行い、0、15、30、60、90 分経過後に、尾から採血し、血中グルコース濃度を FreeStyle Freedom monitoring system (Abbott Laboratories) を用いて測定した。

組織学的解析

性腺周囲脂肪組織と肝臓組織は 4%PFA での固定後、パラフィン包埋切片の HE 染色、および F4/80 に対する免疫染色を行った。

HE 染色後、脂肪細胞の脂肪滴の面積、肝臓の脂質部分の面積を計測し、BIOREVO BZ-9000 および BZ-Analyzer-II Software (Keyence、大阪) を用いて定量比較した。

免疫染色には、シンプルステイン MAX-PO(R) (Nichirei Bioscience, Inc., 東京) を用いた。脱パラフィン処理後、抗原賦活化、ブロッキングを行ったのちに、一次抗体には、抗 F4/80 抗体 (1:100) (ab111101; Abcam, Cambridge, UK) を用いた。シンプルステインラビット MAX-PO を反応させた後、DAB にて発色を行い、ヘマトキシリンを用いた対比染色を行った。

定量 RT-PCR 法

Sepasol-RNA I super G (ナカライテスク) と High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics) を用いて、安楽死後のマウスから摘出した脂肪組織より、全 RNA を抽出した。全 RNA 量を揃え (500 ng/ 20 μ l/ reaction)、ReverTra Ace Kit (東洋紡) を用いて逆転写した。得られた cDNA について、Thermal Cycler Dice Realtime system II (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて、TaqMan プローブ法によって遺伝子増幅、測定を行った。すべての遺伝子の PCR 反応において、アニーリング温度は 60 $^{\circ}$ C とした。使用したプローブ (Universal Probe Library, Roche Diagnostics)、プライマー、増幅産物の大きさを (表 1) に示す。

統計解析

すべてのデータは平均 \pm 標準誤差で表し、two way ANOVA にて統計学的解析を行った。また、5%水準で有意差があると判定した。

結 果

(1) 妊娠母体の栄養状態と GluOC 経口摂取による仔の体重変化

(図 1A)に実験プロトコルを示す。

9 週齢 C57BL/6N 雌マウスを普通食 (ND) 摂取群と高脂肪高シヨ糖食 (HFS) 摂取群とに分け、同週齢の C57BL/6N 雄マウスと交配させた。

さらに、それぞれの群に対して、生理食塩水 (saline) あるいは GluOC (10 ng/ g body weight) を毎日経口投与した。これらの群をそれぞれ、ND-saline、ND-GluOC、HFS-saline、HFS-GluOC と称し、出産日以降、母親マウスの食餌はすべて ND とした。

生後 24 日で離乳させた仔マウスは、以後さらに ND 摂取群と HFS 摂取群とに分けて群飼育を行い (計 16 グループ)、雌雄別に解析を行った。実験は 2 クール行い、同様の結果が認められた。

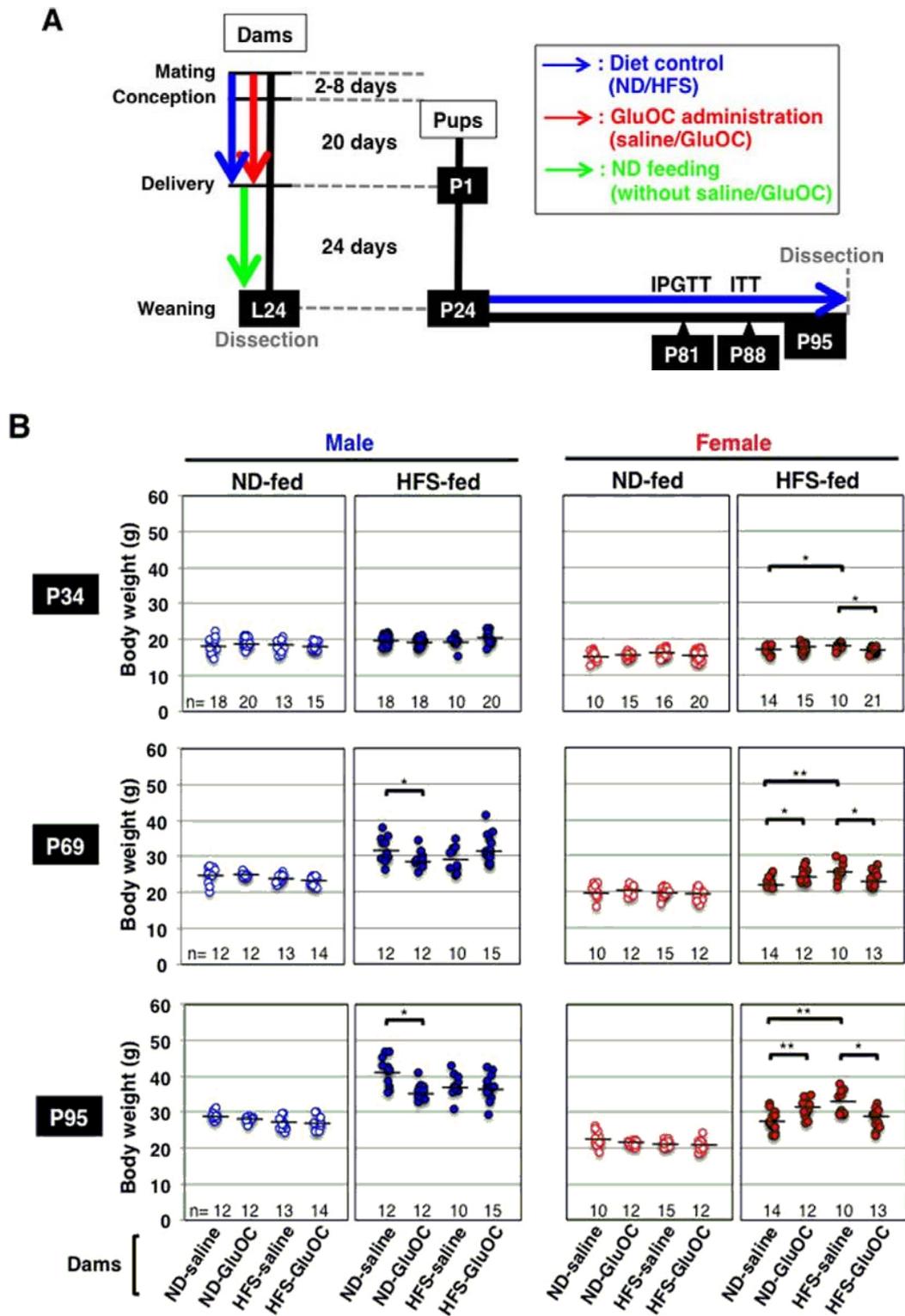
仔の 34 日齢、69 日齢、95 日齢における体重を示す (図 1B)。

仔が ND を摂取していた場合、各群に有意な差は得られなかった。

一方、HFS を摂取していた場合、雌仔では、母親の妊娠中に HFS を摂取していると、仔マウスの体重が有意に増加し、これらの体重増加は母親マウスが妊娠中に GluOC を摂取することで抑制された。

雄仔では、母親の妊娠中の食餌には影響を受けず、むしろ仔自身の HFS 摂取によって体重増加が認められ、この体重増加についても、母親マウスが妊娠中に GluOC を摂取することで抑制された。

これらの結果から、母親の妊娠中の栄養状態に加え、GluOC 摂取の有無も、仔の成熟後の健康状態に影響を及ぼしていることが示唆された。



(図1) 妊娠母体の栄養状態と GluOC 摂取の有無が仔の体重に与える影響

(A) 実験スケジュール。(B) 生後 35 日、69 日、95 日目での仔の体重。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

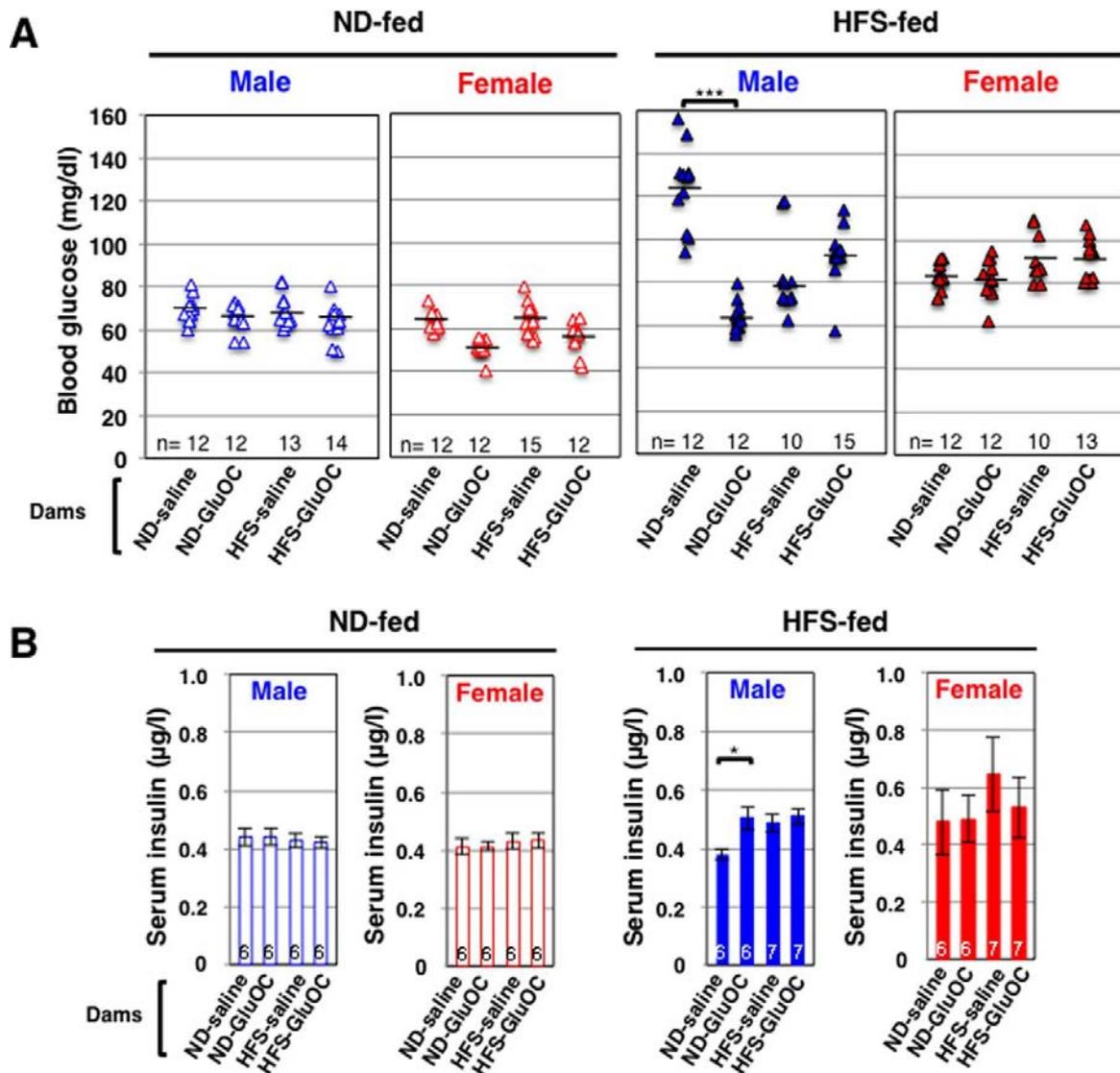
(2) 妊娠母体の栄養状態と GluOC 経口摂取が成熟後の仔の空腹時血糖濃度および空腹時血中インスリン濃度に与える影響

母親の妊娠中の食餌と GluOC 摂取の有無が、次世代の糖代謝に及ぼす影響について調べるために、まず、十分に成熟した段階(95 日齢)での仔の空腹時血糖濃度と空腹時血中インスリン濃度の測定を行った。

仔自身が ND を摂取している場合は、明らかな差は認められなかった(図 2A、B)。

一方、仔が HFS を摂取している場合、雌仔では各群に変化は認められなかった(図 2A、B)。

また、雄仔では、ND-saline 群で空腹時血糖濃度が上昇し、その際の血中インスリン濃度が低下していた(図 2A、B)。この傾向は、ND-GluOC 群では認められなかったことから、母親の妊娠中 GluOC 摂取は、次世代の仔の糖代謝異常を正常化させる可能性が示唆された。



(図2) 成熟した仔マウス(95日齢)における空腹時血糖濃度と空腹時血中インスリン濃度

21時間絶食後の空腹時血糖濃度(A)と空腹時血中インスリン濃度(B)。空腹時血中インスリン濃度の平均値には棒を記した。また、インスリン濃度は平均値±標準誤差で表記した。棒グラフ内の数字は、動物のn数を示す。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

(3) 妊娠母体の栄養状態と GluOC 経口摂取が成熟後の仔の耐糖能に与える影響

そこで、母親の妊娠中の食餌と GluOC 摂取の有無が、次世代の耐糖能に与える影響について調べるために、成熟した各群の仔に対して糖負荷試験を行い、比較を行った。

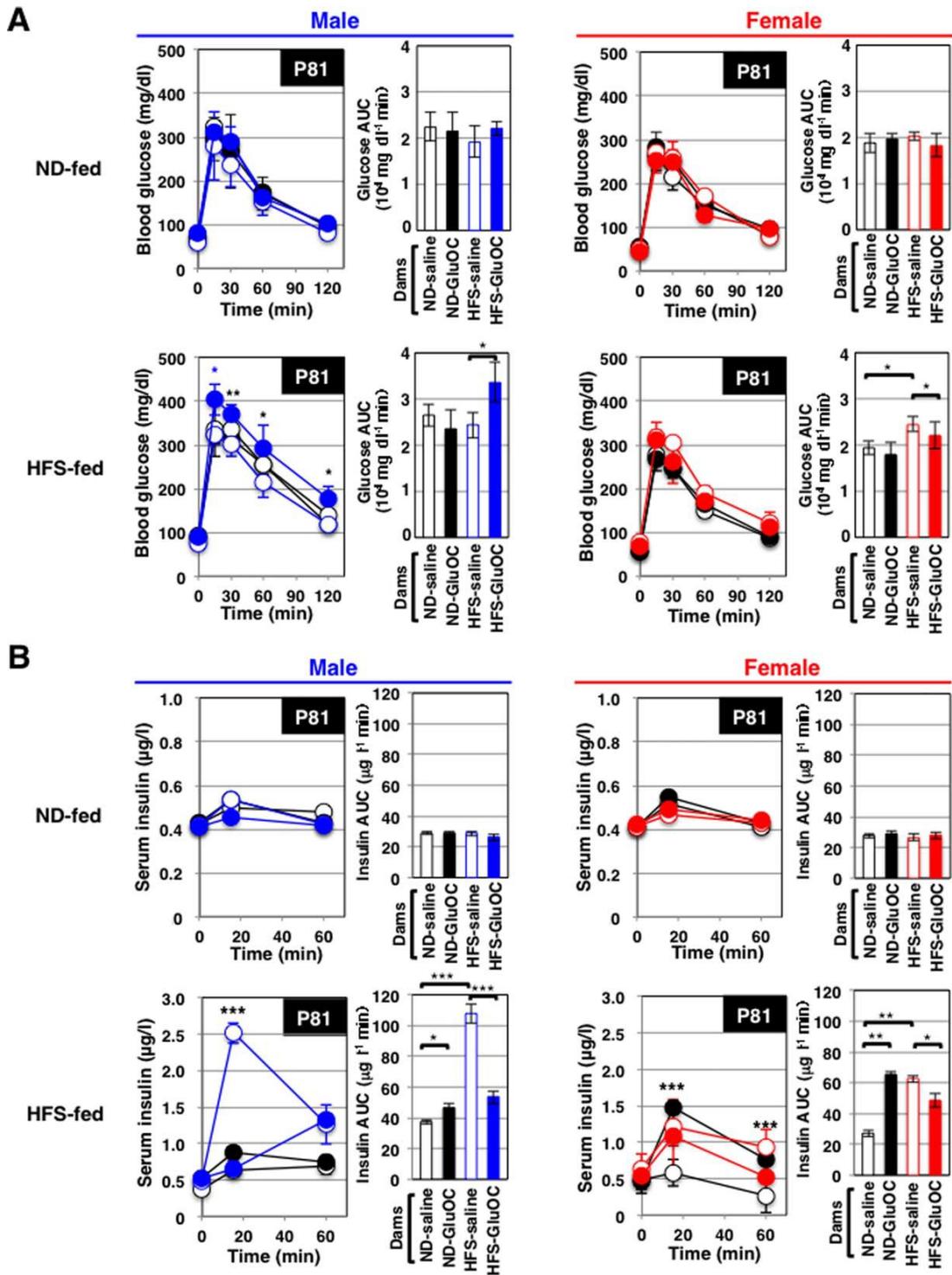
解析の結果、仔自身が ND を摂取している場合には、糖負荷時の血糖濃度や血中インスリン濃度は、各群に差は認められなかった(図 3A、B)。

また、ND 摂取群に比べ、HFS 摂取群では、全体的に耐糖能の低下(図 3A)や、インスリン分泌量の増加(図 3B)が認められた。

特に、仔自身が HFS を摂取している場合、雌雄ともに ND-saline 群に比べて、ND-GluOC 群で、糖負荷時の血中インスリン濃度の増加が認められた(図 3B)。

また、HFS を摂取している雄仔の HFS-saline 群では、顕著なインスリン分泌亢進が認められたが、この傾向は母親の妊娠中 GluOC 摂取により回避された(図 3B)。

これらのことから、母親の妊娠中の食餌と GluOC 摂取の有無が、仔の糖処理能力に影響を及ぼすこと、また、その表現型の現れ方には性差があることが示された。



(図3) 成熟した仔マウス(81日齢)における糖負荷試験時の血糖濃度と血中インスリン濃度

糖負荷試験(1.5 g/kg body weight、腹腔内投与)を行ったときの血糖濃度(A)と血中インスリン濃度(B)の経時変化。それぞれのAUC(Area under the blood concentration-time curve; 血中濃度-時間曲線下面積)のグラフは、平均値±標準誤差で表記した。 $8 \leq n \leq 12$ 。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

(4) 妊娠母体の栄養状態と GluOC 経口摂取が成熟後の仔のインスリン感受性に与える影響

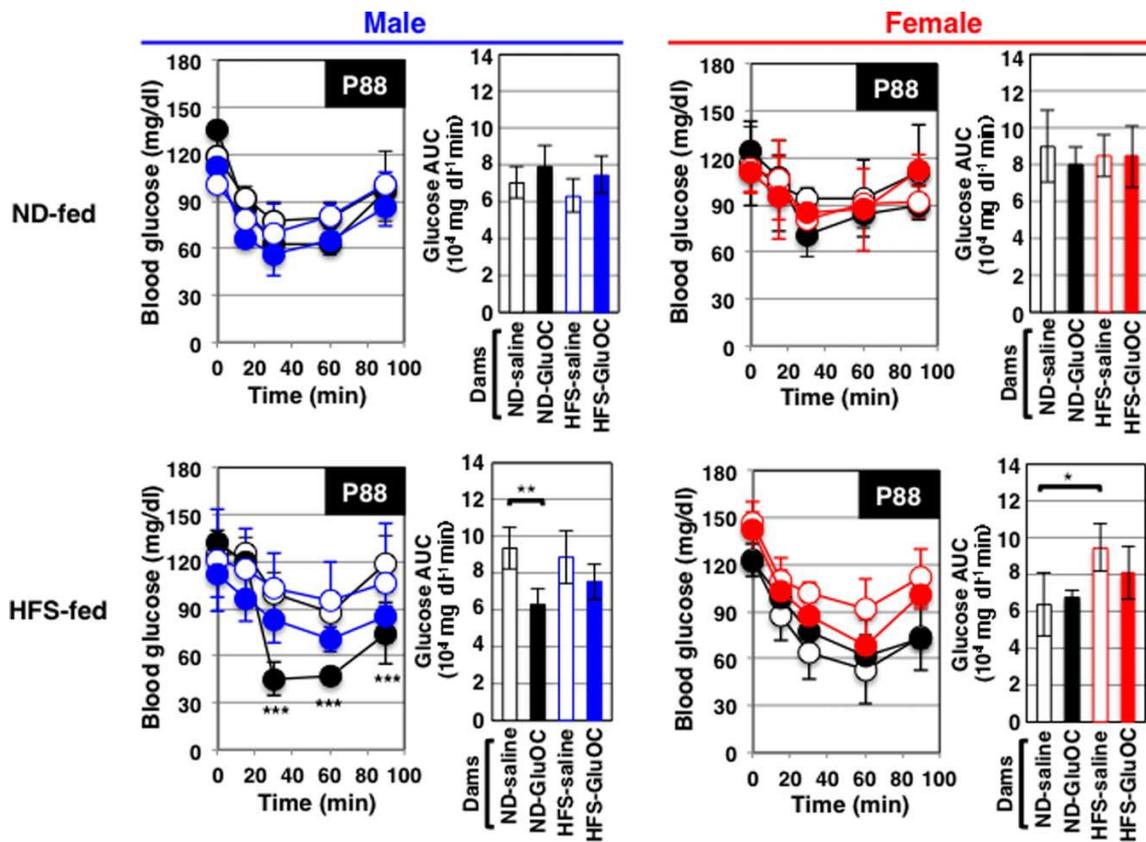
続いて、母親の妊娠中の食餌と GluOC 摂取の有無が、次世代のインスリン感受性に与える影響について調べるために、成熟した各群の仔に対してインスリン負荷試験を行い、比較を行った。

インスリン負荷時の血糖濃度について、仔自身が ND を摂取している場合には、各群に差は認められなかった(図 4)。

一方、HFS 摂取群では、雄仔において、ND-saline 群と ND-GluOC 群とに有意な差が認められ、母親の妊娠中の GluOC 摂取が、インスリン感受性を増強させる結果となった(図 4)。

また、雌仔では母親の妊娠中の食餌が ND であった群(ND-saline)に対して、HFS であった群(HFS-saline)では、インスリン感受性が低下することが示された。しかし、母親の妊娠中 GluOC 摂取の有無による有意な差は、認められなかった(図 4)。

これらのことから、母親の妊娠中の食餌と GluOC 摂取の有無は、仔のインスリン感受性に影響を及ぼす場合があり、また、その表現型の現れ方には性差があることが示された。



(図 4) 成熟した仔マウス(88 日齢)におけるインスリン負荷試験時の血糖濃度

インスリン負荷試験 (ND 摂取マウスに対して 0.5 U/ kg body weight、HFS 摂取マウスに対して 1.2 U/ kg body weight、腹腔内投与)を行ったときの血糖濃度の経時変化 (0、15、30、60、90 分後)と AUC。それぞれの AUC のグラフは、平均値 ± 標準誤差で表記した。 $8 \leq n \leq 12$ 。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

(5) 妊娠母体の栄養状態と GluOC 経口摂取が成熟後の仔の脂質代謝に与える影響 (雌仔)

続いて、母親の妊娠中の食餌と GluOC 摂取の有無が、次世代の脂質代謝に及ぼす影響について雌雄別に解析を行った。(図 5)に、雌仔の結果を示す。

成熟した雌仔の血清脂質の測定結果において、ND 摂取群では各群に差は認められなかった。また、HFS 摂取群では、総コレステロール値については HFS-saline 群で、LH 比については ND-saline 群と HFS-saline 群で顕著な値の上昇を認めしたが、それらはいずれも、母親の妊娠中 GluOC 摂取によって改善された(図 5A)。

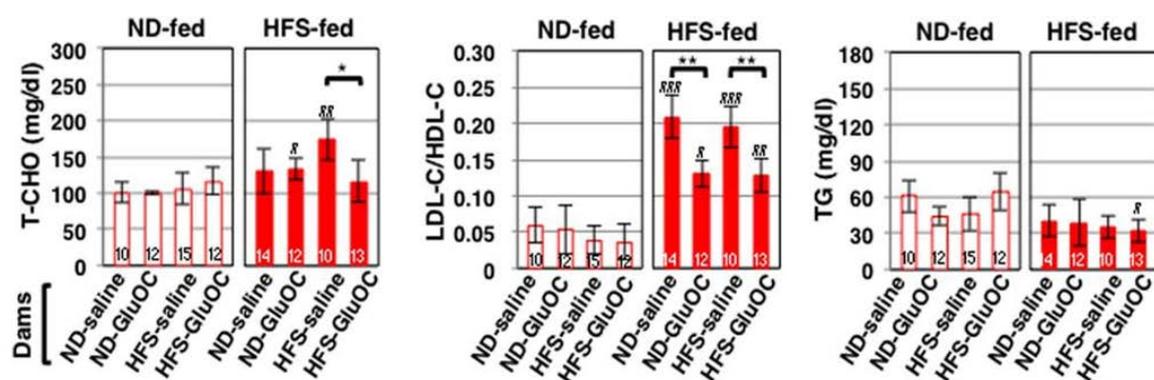
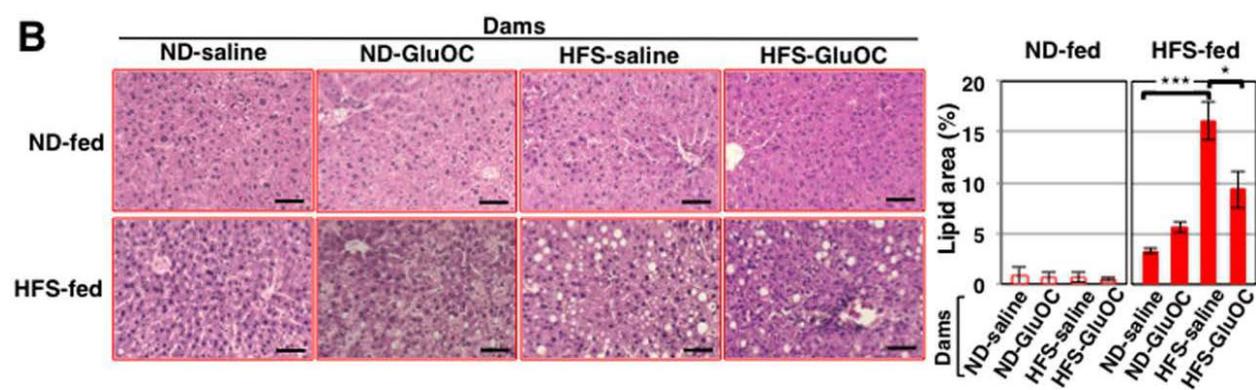
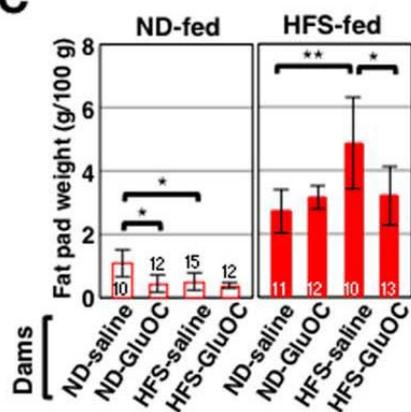
肝臓組織への脂肪滴沈着について調べたところ、ND 摂取群では各群に差は認められなかった。一方、HFS 摂取群では、ND 摂取群に比較して多くの脂肪滴が観察され、特に HFS-saline 群で著しい増加が認められた。また、その傾向も、母親の妊娠中 GluOC 摂取によって改善された(図 5B)。

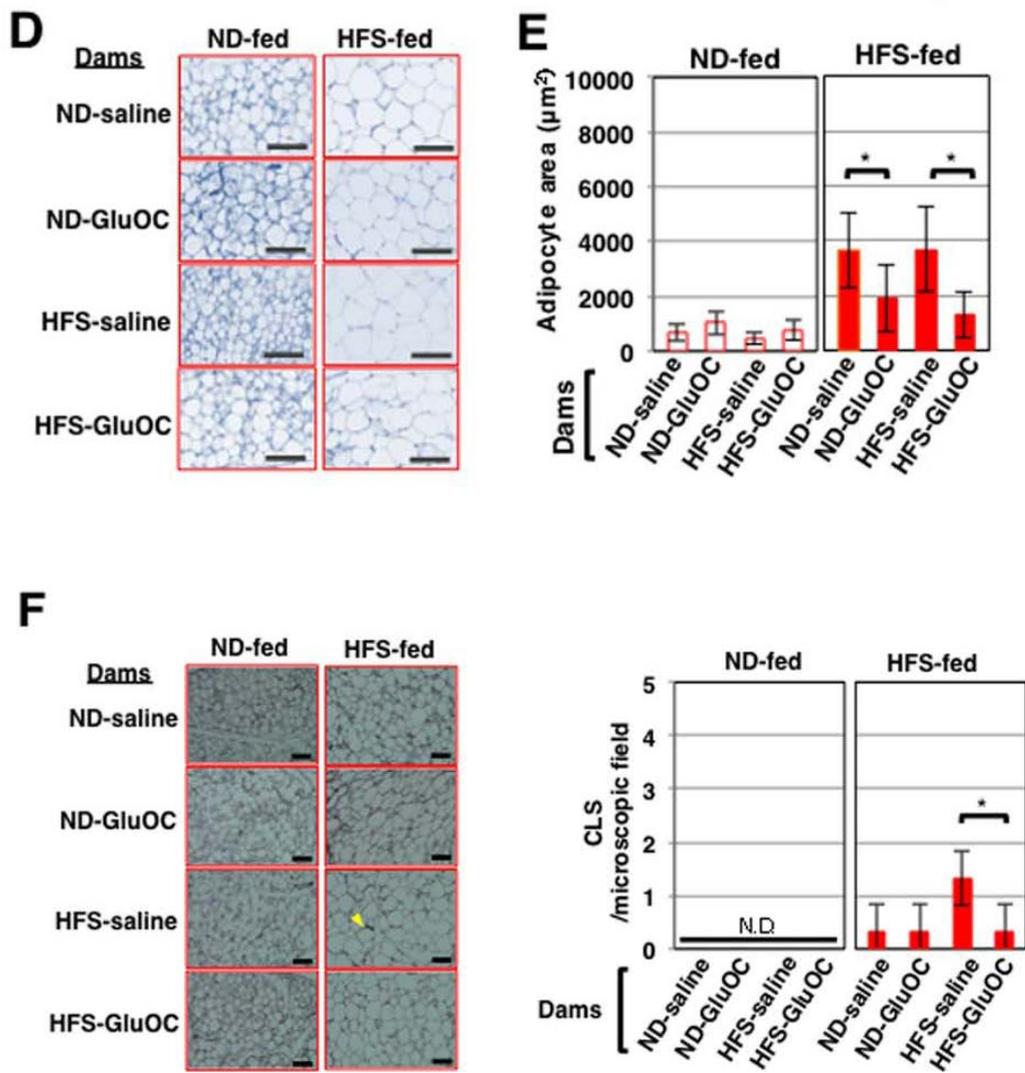
続いて、脂肪組織を用いた解析を行った(図 5C、D、E)。

まず、体重当たりの性腺周囲脂肪組織の重量を比較したところ、ND 摂取群では、ND-saline 群は、HFS-saline 群より有意に脂肪重量が増加していることが示された。また、HFS 摂取群では、HFS-saline 群で ND-saline 群に比べて有意に脂肪重量が増加しており、その傾向は母親の妊娠中 GluOC 摂取により回避されていた(図 5C)。

組織学的解析では、特に脂肪細胞の大きさに着目した。ND 摂取群では各群に有意な差は認められなかった。一方、HFS 摂取群では、ND-saline 群および HFS-saline 群で脂肪細胞のサイズが著しく増加していたが、この傾向は、母親の妊娠中 GluOC 摂取により回避されていた(図 5D、E)。

さらに、マクロファージのマーカーである F4/80 の発現を調べたところ、脂肪の過剰蓄積により肥大化して細胞死に至った脂肪細胞をマクロファージが取り囲んで処理する際に見られる構造物である CLS(Crown-like structure)(33)が HFS-saline 群で数多く認められ、この傾向も、母親の妊娠中 GluOC 摂取により回避されていた(図 5F)。

A**B****C**



(図 5) 成熟した雌仔マウス(95 日齢)における各脂質代謝パラメータの解析

(A) 血中総コレステロール値、LDL/HDL 比、中性脂肪値を平均値±標準誤差で表記した。(B) 肝臓組織の HE 染色、および肝臓組織に沈着した脂肪滴の 1 視野当たりの面積。(C) 性腺周囲脂肪組織重量の体重比。(D) 脂肪組織の HE 染色と、脂肪細胞の面積(E)。(F) 脂肪組織の F4/80 に対する免疫染色、および 1 視野当たりの CLS 個数の測定結果。組織写真内の矢印は CLS を示す。棒グラフ内の数字は、動物の n 数を示す。Scale bars: 100 μ m。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。また、ND 摂取群のそれぞれ対応する群間での統計学的有意差を # $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 、### $P < 0.001$ で表す。面積の測定は、3 匹分、各 2 スライドを用いて測定を行った。

(6) 脂肪組織内マクロファージの機能解析(雌仔)

肥満に伴い脂肪組織に浸潤するマクロファージは単一ではなく、異なる性質をもつマクロファージで構成されている(34)。例えば、M1型マクロファージは炎症性サイトカインを高発現し、インスリン抵抗性を増悪させるが、M2型マクロファージは抗炎症性サイトカインを高発現し、インスリン感受性に寄与することが知られている(34)。

そこで、前述(図 5F)の結果で認められたマクロファージが、どのような性質をもつのか調べるために、M1型マクロファージのマーカーとして CD11c、Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)、Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6(IL-6)、また、M2型マクロファージのマーカーとして interleukin-10(IL-10)と Arginase を指標として、それらの脂肪組織内での mRNA 発現量を定量 RT-PCR(表 1)を用いて解析した(図 6A、B、C、D、E、F、G)。

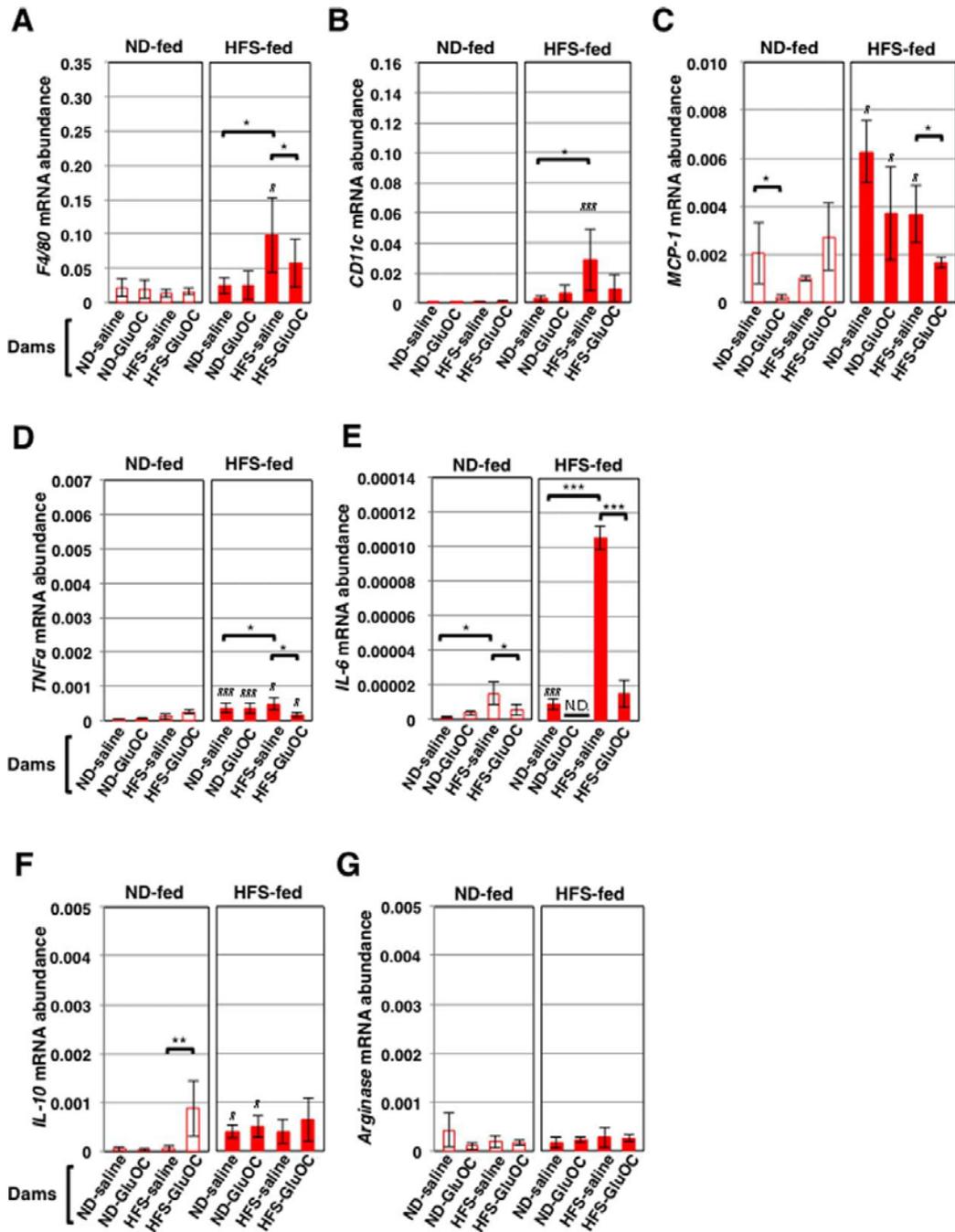
各種 M1型マクロファージのマーカー(図 6A、B、C、D、E)の発現量は、MCP-1の ND-saline 群および ND-GluOC 群における発現パターンを除き、(図 5F)における F4/80 の発現量と正の相関をもつ結果となった。そのため、ND-saline 群および ND-GluOC 群における MCP-1 の高発現は、脂肪組織内マクロファージではなく、他の細胞由来である可能性が考えられた。

一方、M2型マクロファージのマーカー(図 6F、G)は、IL-10 が ND を摂取している HFS-GluOC 群で上昇が認められたが、その原因は不明であった。

以上の結果、および、一般に CLS の形態をとるマクロファージは M1型マクロファージに由来するものの割合が多いことが報告されている(33-34)ことから、今回(図 5F)で認められた脂肪組織内マクロファージの浸潤像は、炎症反応を示すものであったといえるかもしれない。

Gene	Direction	Primer sequence	Base pairs	Probe No.
<i>GAPDH</i>	Forward	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	75 bp	80
	Reverse	CCTGCTTCACCACCTTCTTG		
<i>F4/80</i>	Forward	GGAGGACTTCTCCAAGCCTATT	70 bp	42
	Reverse	AGGCCTCTCAGACTTCTGCTT		
<i>CD11c</i>	Forward	GAGCCAGAACTTCCCAACTG	65 bp	18
	Reverse	TCAGGAACACGATGTCTTGG		
<i>MCP-1</i>	Forward	TACAGCCAATCAGCCATCTG	130 bp	16
	Reverse	GGTTCTGCTGGCCTTCCT		
<i>TNF-α</i>	Forward	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	128 bp	49
	Reverse	GGTCTGGGCCATAGAACTGA		
<i>IL-6</i>	Forward	GCTACCAAAGCTGGATATAATCAGGA	78 bp	6
	Reverse	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA		
<i>IL-10</i>	Forward	CAGCCGGGAAGACAATAACT	121 bp	48
	Reverse	GTTGTCCAGCTGGTCCTTTG		
<i>Arginase</i>	Forward	GAATCTGCATGGGCAACC	73 bp	2
	Reverse	GAATCCTGGTACATCTGGGAAC		

(表 1) 定量 RT-PCR に用いたプローブおよびプライマーと増幅産物の大きさ



(図6) 成熟した雌仔マウス(95日齢)脂肪組織における各種マクロファージマーカーの発現量

性腺周囲白色脂肪組織における mRNA 発現量。(A) *F4/80*、(B) *CD11c*、(C) *MCP-1*、(D) *TNF- α* 、(E) *IL-6*、(F) *IL-10*、(G) *Arginase*。N=6。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。また、ND 摂取群のそれぞれ対応する群間での統計学的有意差を # $P < 0.05$ 、### $P < 0.001$ で表す。

(7) 妊娠母体の栄養状態と GluOC 経口摂取が成熟後の仔の脂質代謝に与える影響
(雄仔)

(図 5)と同様の実験を、雄仔で行った結果を示す。

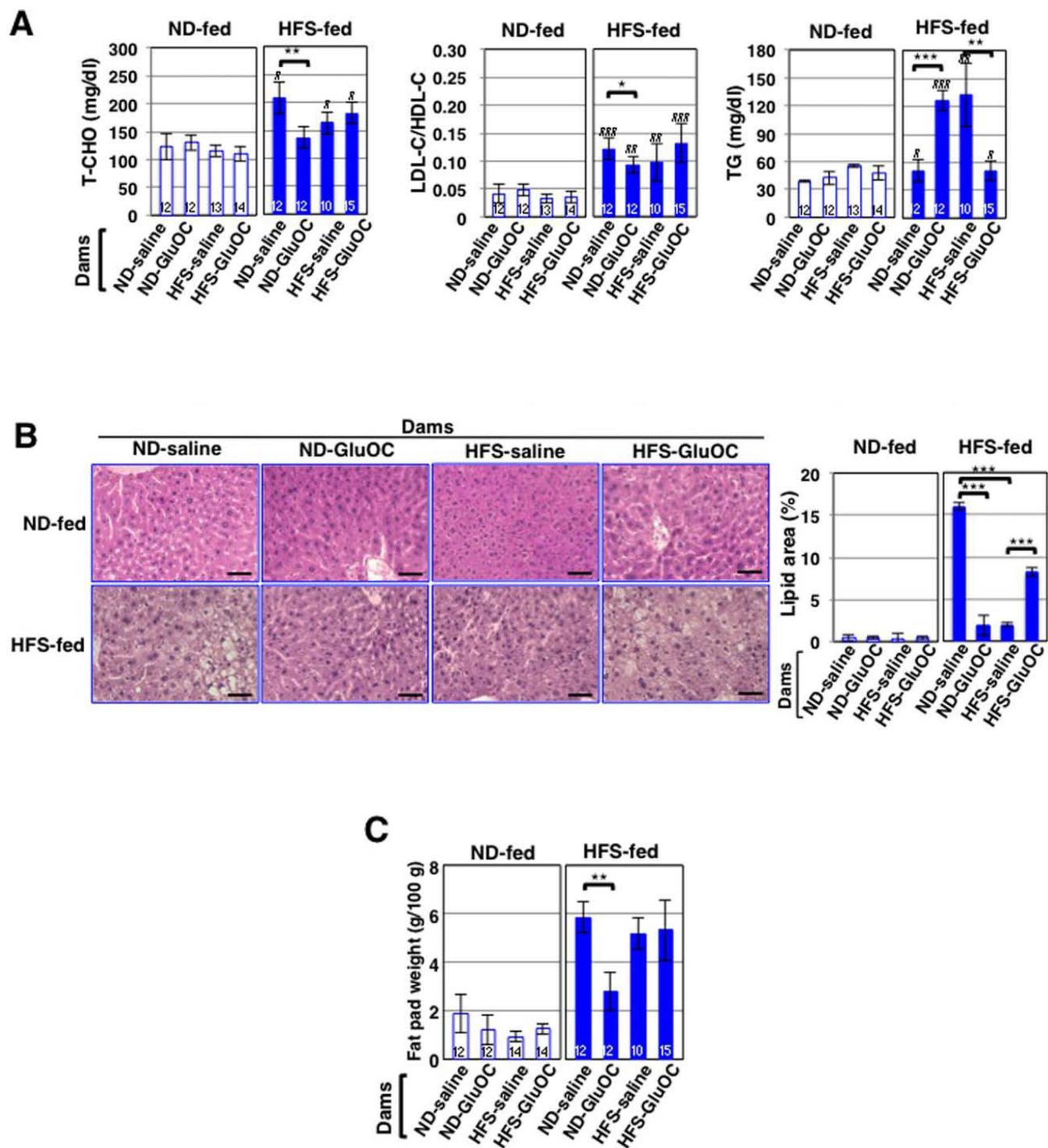
成熟した雄仔の血清脂質の測定結果において、ND 摂取群では各群に差は認められなかった。また、HFS 摂取群では、総コレステロール値と LH 比については ND-saline 群で、中性脂肪値については HFS-saline 群で顕著な値の上昇を認めたが、それらはいずれも、母親の妊娠中 GluOC 摂取によって改善された(図 7A)。また、中性脂肪値について、ND-saline 群に比べて、ND-GluOC 群で有意な上昇が認められた(図 7A)。

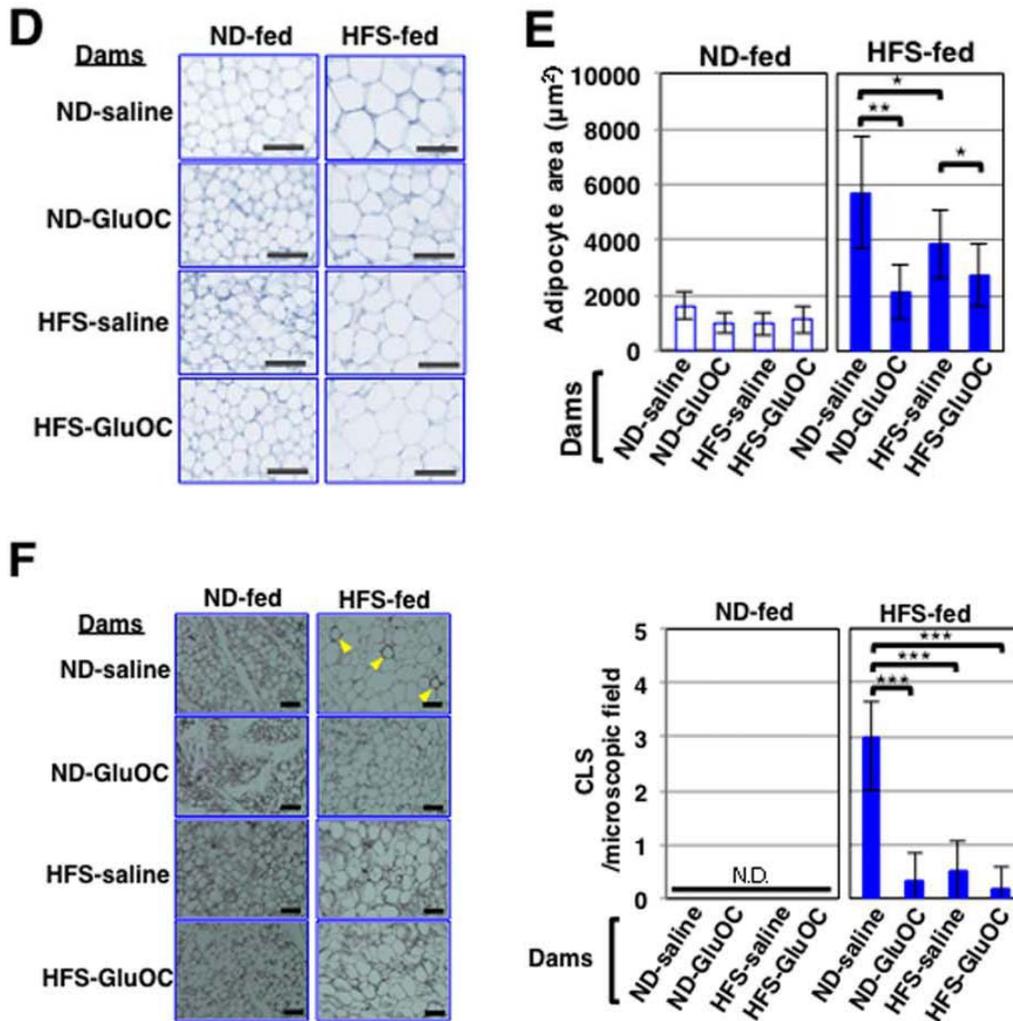
次に、肝臓組織への脂肪滴沈着について調べたところ、ND 摂取群では各群に差は認められなかった。一方、HFS 摂取群では、ND 摂取群に比較して多くの脂肪滴が観察され、特に ND-saline 群で著しい増加が認められたが、その傾向は、母親の妊娠中 GluOC 摂取によって改善された(図 7B)。また、HFS-saline 群に比べて、HFS-GluOC 群で多くの脂肪滴が観察された(図 7B)。原因は不明であるが、血清中の中性脂肪値(図 7A)と肝臓内脂肪沈着量(図 7B)とが逆相関する群が存在したが、このような現象は過去に複数報告されている(21、35-38)。

続いて、体重当たりの性腺周囲脂肪組織の重量を比較したところ、ND 摂取群では各群に変化は認められなかった。また、HFS 摂取群では、ND-saline 群で認められた脂肪重量の増加が、母親の妊娠中 GluOC 摂取により回避されていた(図 7C)。

また、脂肪細胞の大きさについて、ND 摂取群では各群に有意な差は認められなかった。HFS 摂取群では、ND-saline 群および HFS-saline 群で脂肪細胞のサイズが著しく増加していたが、この傾向は、母親の妊娠中 GluOC 摂取により回避されていた(図 7D、E)。

さらに、F4/80 の免疫染色により、HFS を摂取している ND-saline 群で CLS が数多く認められたが、この傾向も、母親の妊娠中 GluOC 摂取により改善した(図 7F)。





(図7) 成熟した雄仔マウス(95日齢)における各脂質代謝パラメータの解析

(A) 血中総コレステロール値、LDL/HDL比、中性脂肪値を平均値±標準誤差で表記した。(B) 肝臓組織のHE染色、および肝臓組織に沈着した脂肪滴の1視野当たりの面積。(C) 性腺周囲脂肪組織重量の体重比。(D) 脂肪組織のHE染色と、脂肪細胞の面積(E)。(F) 脂肪組織のF4/80に対する免疫染色、および1視野当たりのCLS個数の測定結果。組織写真内の矢印はCLSを示す。棒グラフ内の数字は、動物のn数を示す。Scale bars: 100 μm。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。また、ND摂取群のそれぞれ対応する群間での統計学的有意差を# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 、### $P < 0.001$ で表す。面積の測定は、3匹分、各2スライドを用いて測定を行った。

(8) 脂肪組織内マクロファージの機能解析(雄仔)

(図 6)と同様の実験を、雄仔で行った結果を示す。

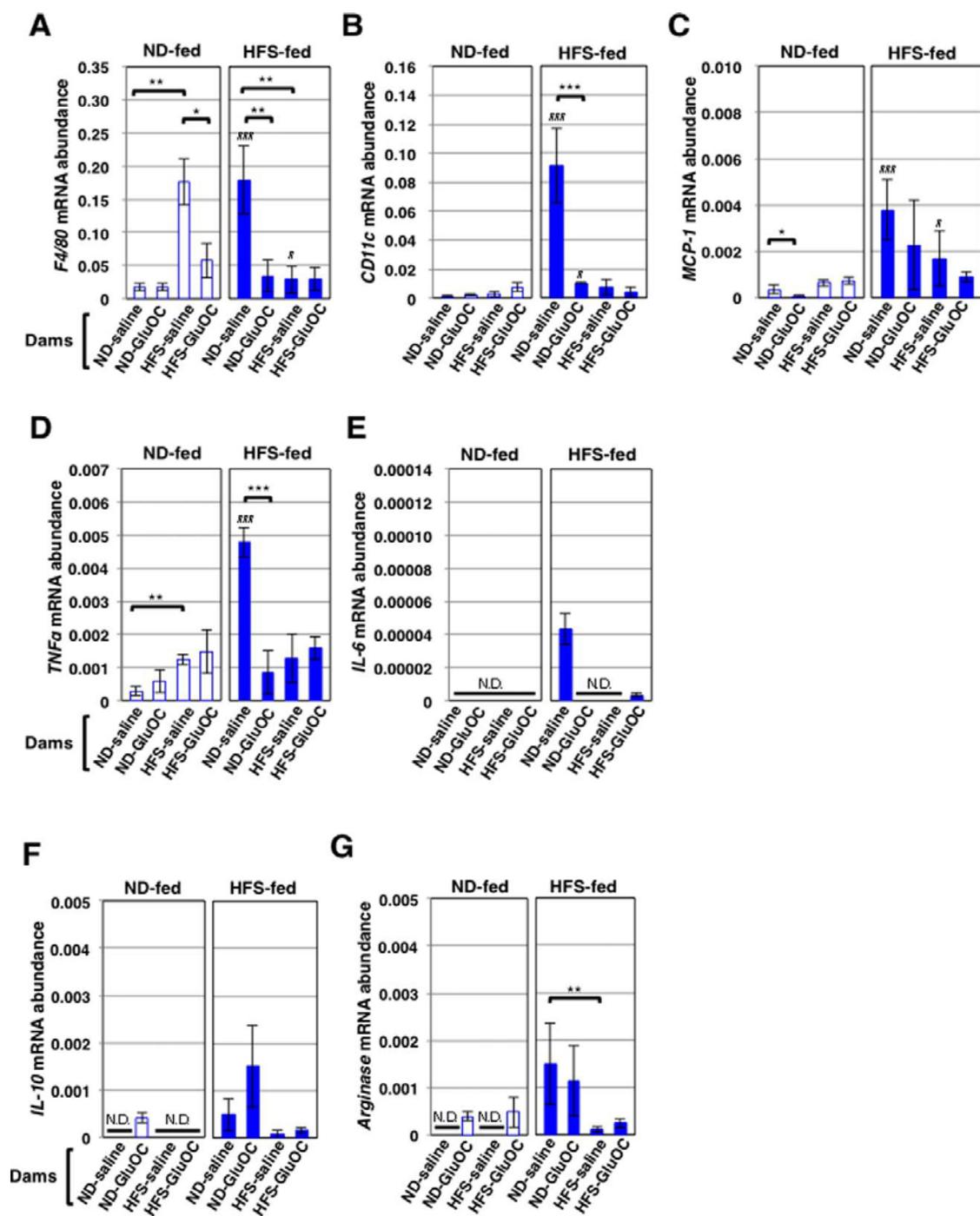
各種 M1 型マクロファージのマーカ―(図 8A、B、C、D、E)の発現量は、(図 7F)における F4/80 の発現量と類似しており、HFS を摂取している ND-saline 群で著しい発現量の増加が認められた。

また、ND を摂取している HFS-saline 群で F4/80(図 8A)および *TNF- α* (図 8D)の mRNA 発現量が増加していた。

F4/80 の発現上昇については、(図 7F)でタンパクレベルとしての発現が認められなかったことから、*TNF- α* の高発現についても、脂肪組織内マクロファージではなく、他の細胞由来である可能性も考えられた。

一方、M2 型マクロファージのマーカ―の脂肪組織での発現量(図 8F、G)について、*Arginase* の発現量が、HFS を摂取している ND-saline 群で、HFS-saline 群と比べて、上昇していた(図 8G)。

これらのことから、HFS を摂取している ND-saline 群の脂肪組織内には、多くのマクロファージが浸潤しており、その多くは M1 型マクロファージであるが、M2 型マクロファージの浸潤が、他の群に比べて多かった可能性が示唆された。



(図 8) 成熟した雄仔マウス(95 日齢) 脂肪組織における各種マクロファージマーカーの発現量

性腺周囲白色脂肪組織における mRNA 発現量。(A) *F4/80*、(B) *CD11c*、(C) *MCP-1*、(D) *TNF-α*、(E) *IL-6*、(F) *IL-10*、(G) *Arginase*。N=6。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。また、ND 摂取群のそれぞれ対応する群間での統計学的有意差を # $P < 0.05$ 、### $P < 0.001$ で表す。

考 察

本研究では、母体の妊娠期栄養状態が、児の成育後の糖脂質代謝異常に及ぼす影響について病態モデルマウスを作成・解析し、生活習慣病胎児起源説の裏付け、さらには、妊娠期にも投与可能な生体由来の蛋白質であるオステオカルシンを用いた妊娠期糖脂質代謝異常の予防法を追究した。

近年、生活習慣病胎児起源説(DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease)という概念が注目され、様々な疫学調査によって実証されつつある(13-16)。これは、母体の妊娠期栄養状態が、児の将来の生活習慣病発症リスクを左右していることを示唆しており、妊娠期・周産期における糖脂質代謝異常が世代を越えて受け継がれていくことを意味している。

この説を鑑みると、生活習慣病人口が急増している我が国において(39)、将来を見据えた生活習慣病予防を行うためには、妊娠期母体の糖脂質代謝の正常化が必須となる。

最近、オステオカルシンの受容体である Gprc6a が小腸上皮細胞に発現していることが証明され(3)、GluOC が、糖脂質代謝関連臓器への直接的な糖脂質代謝改善作用のみならず、インクレチンである GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)を介した間接的な血糖降下作用を持ち、個体の代謝を制御していることが証明された(2-3)。

さらに、近年、GLP-1 受容体応答が妊婦の生理的耐糖能維持や脂質代謝に重要な役割を担っていることが報告され(40)、妊娠期の糖脂質代謝において、GLP-1 が重要な役割を果たしていることが証明された。母体が摂取した GluOC が胎盤通過性をもつことも明らかであることから(17)、本研究では、高脂肪高シヨ糖食を摂取している妊娠母体に GluOC を飲用させることで、世代を超えた GluOC による糖脂質代謝制御の可否を検討した。

解析の結果、妊娠母体の栄養状態と、経口での妊娠中 GluOC 摂取が次世代の糖脂質代謝に影響を与えることが証明された。

雌では、妊娠母体の HFS 摂取は、仔自身が ND を摂取している場合、特に顕著な影響を示さなかったが、仔が HFS を摂取する場合、体重増加やインスリン抵抗性、耐糖能低下が誘導されることが示唆された。加えて、血中の脂質パラメータの上昇、肝臓の脂質蓄積、性腺周囲脂肪組織の慢性炎症が認められ、肥満の進行が認められた。

また、雄では、妊娠母体がNDを摂取していた場合、仔へのHFS負荷が、先述の雌と似た傾向を示すようになり、体重、血清脂質、脂肪重量、脂肪細胞面積の増加や、性腺周囲脂肪組織での慢性炎症が認められた。母体と仔の栄養状態について、出生前と出生後での栄養状態の不一致が疾病の病因になるという報告があり(41)、性特異的に心血管疾患、代謝異常、脂肪組織の増加が男性で起こることも報告されている(42、43)ことから、この現象がマウスのみならず、ヒトにおいても当てはまる可能性が高い。

以上のような、妊娠母体の過栄養が仔に与える負の影響は、妊娠母体がGluOCを経口摂取することで回避された。このことから、妊娠母体が摂取したGluOCが、①GLP-1応答を介して妊娠母体の糖脂質代謝が正常化され、そのことが間接的に胎児の糖脂質代謝関連臓器に影響を与えた可能性、かつ、(もしくは、)②胎盤を通過し、何らかの作用機序を以て直接的に胎児の糖脂質代謝関連臓器に影響を与えている可能性が示唆された。なお、GluOCへの感受性には性差が認められた。

総 括

本研究では、GluOC が個体において、また世代間に渡って、複数の機序を介して多様な糖脂質代謝改善効果を有していることを証明した。

まず、第1章において、腹腔内投与した GluOC の動脈硬化の発症抑制効果について解析を行った。その結果、GluOC が、複数の動脈硬化抑制作用をもつ NO の産生を直接制御していること、またコレステロールの代謝に深く関わっている可能性を提示した。

続いて、第2章では、栄養状態の異なる妊娠母体に経口投与された GluOC が次世代の糖脂質代謝に及ぼす影響について、解析を行った。

近年、妊娠母体の栄養状態が、いわゆる“メタボリックメモリー”として胎児に刻印され、次世代に影響し続けることが示唆されているが、本研究では、その刻印されたメタボリックメモリーを封印する方法として、妊娠母体への胎盤通過性非(低)カルボキシル化オステオカルシン(GluOC)の経口投与が効果的であることを実証した。

本研究結果を以て、生活習慣病予防あるいは治療手段のひとつとして、生体由来のタンパク質である GluOC が有用である可能性を提示した。

今後、GluOC の糖脂質代謝制御の分子基盤、投与方法や有効血中濃度、安全性について、さらなる検討を行っていく。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御高閲を頂きました九州大学大学院 歯学
研究院 口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野前教授であり、現在、福岡歯科大
学 口腔歯学部 平田 雅人 客員教授に深甚なる感謝の意を表します。直接御指導
いただき、本稿と投稿論文作成に際し様々なご協力や御助言を頂きました福岡大学
薬学部 統合臨床医学講座 免疫・分子治療学分野 安河内(川久保) 友世 講師
に深甚なる感謝の意を表します。九州大学大学院 歯学研究院附属 オーラルヘル
ス・ブレインヘルス・トータルヘルス研究センター(OBT 研究センター)ならびに九州
大学大学院 歯学研究院 口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野 自見 英治郎
教授に深甚なる感謝の意を表します。また、大学院入学時より様々な御助言を頂きま
した九州大学大学院 歯学研究院 口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野の皆様
に深謝いたします。

参 考 文 献

1. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* 2007; 130:456-469.
2. Mizokami A, Yasutake Y, Gao J, Matsuda M, Takahashi I, *et al.* Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLoS One.* 2013; 8:e57375.
3. Mizokami A, Yasutake Y, Higashi S, Kawakubo-Yasukochi T, Chishaki S, *et al.* Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone.* 2014; 69:68-79.
4. Otani T, Mizokami A, Hayashi Y, Gao J, Mori Y, *et al.* Signaling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cell Signal.* 2015; 27:532-544.
5. Magni P, Macchi C, Sirtori CR, Romanelli MMC. Osteocalcin as a potential risk biomarker for cardiovascular and metabolic diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2016; 54: 1579-1587.
6. Filip R, Possemiers S, Heyerick A, Pinheiro I, Raszewski G, *et al.* Twelvemonth consumption of a polyphenol extract from olive (*Olea europaea*) in a double blind, randomized trial increases serum total osteocalcin levels and improves serum lipid profiles in postmenopausal women with osteopenia. *J Nutr Health Aging.* 2015; 19: 77-86.
7. Chen L, Li Q, Yang Z, Ye Z, Huang Y, *et al.* Osteocalcin, glucose metabolism, lipid profile and chronic low-grade inflammation in middle-aged and elderly Chinese. *Diabet Med.* 2013; 30: 309-317.
8. Ma H, Lin H, Hu Y, Li X, He W, *et al.* Serum levels of osteocalcin in relation to glucose metabolism and carotid atherosclerosis in Chinese middle-aged and elderly male adults: the Shanghai Changfeng Study. *Eur J Intern Med.* 2014;25(3):259-64.
9. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit.

- J Clin Invest. 1992; 90: 1168-1172.
10. Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, *et al.* Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 746-752
 11. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, *et al.* Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation.* 2001; 104: 448-454.
 12. Hogg N, Struck A, Goss SP, Santanam N, Joseph J, *et al.* Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric-oxide donors. *J Lipid Res.* 1995; 36(8):1756-62.
 13. Yokomizo H, Inoguchi T, Sonoda N, Sakaki Y, Maeda Y, *et al.* Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic b-cell function in adult offspring with sex differences in mice. *Am J Physiol* 2014; 306:E1163-E1175.
 14. McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Friedman JE, *et al.* Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest* 2009; 119:323-335.
 15. Mischke M, Pruis MG, Boekschoten MV, Groen AK, Fitri AR, *et al.* Maternal Western-style high-fat diet induces sex-specific physiological and molecular changes in two-week-old mouse offspring. *PLoS One* 2013 e;8:e78623.
 16. Dabelea D, Crume T. Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes. *Diabetes* 2011; 60:1849-1855.
 17. Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, *et al.* Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell* 2013; 155:228-241.
 18. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012; 9: 671-675.
 19. Fernandez ML, Webb D. The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. *J Am Coll Nutr.* 2008; 27: 1-5.
 20. Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery.* 1997; 22: 266-277.
 21. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Jammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver

- and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element binding protein. *J Clin Invest* 1998; 101:2331-2339.
22. Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* 1996; 271: 26461-26464.
 23. Zhang Y, Breevoort SR, Angdisen J, Fu M, Schmidt DR, *et al.* Liver LXR α expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest.* 2012; 122: 1688-1699.
 24. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14: 2831-2838.
 25. Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T, Okuhira K, Suzuki K, *et al.* Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* 2007; 282: 21090-21099.
 26. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Knut EB, Jay DH, *et al.* Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* 2002; 110: 671-680.
 27. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000; 14: 2819-2830.
 28. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
 29. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
 30. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45021-45026.
 31. Hsueh W, Abel ED, Breslow JL, Maeda N, Davis RC, *et al.* Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007; 100: 1415-1427.
 32. Jeon US, Choi JP, Kim YS, Ryu SH, Kim YK. The enhanced expression of IL-17-secreting T cells during the early progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed on a western-type diet. *Exp Mol Med.* 2015; 47: e163
 33. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and

- humans. *J Lipid Res* 2005; 46:2347-2355.
34. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011; 121(6): 2094–2101.
 35. Oribe J, Kakuma T, Haranaka M, Okamoto K, Seike M, *et al.* Intraperitoneal administration attenuates thiazolidinedione-induced hepatic steatosis in KKAY mice with increased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-mRNA expression. *Obes Res Clin Pract* 2012; 6:e249-e261.
 36. Chambers KT, Chen Z, Crawford PA, Fu X, Burgess SC, *et al.* Liver-specific PGC-1beta deficiency leads to impaired mitochondrial function and lipogenic response to fasting/refeeding. *PLoS One* 2012; 7: e52645.
 37. Jo H, Choe SS, Shin KC, Jang H, Lee JH, *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. *Hepatology* 2013; 57:1366-1377.
 38. Sohi G, Revesz A, Hardy DB. Nutritional mismatch in postnatal life of low birth weight rat offspring leads to increased phosphorylation of hepatic eukaryotic initiation factor 2 α in adulthood. *Metabolism* 2013; 62:1367-1374.
 39. Chinn S, Rona RJ. Prevalence and trends in overweight and obesity in three cross sectional studies of British children, 1974-94. *Br Med J* 2001; 322:24-26.
 40. Moffett RC, Vasu S, Thorens B, Drucker DJ, Flatt PR. Incretin receptor null mice reveal key role of GLP-1 but not GIP in pancreatic beta cell adaptation to pregnancy. *PLoS One.* 2014;9(6):e96863
 41. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004; 305:1733-1736.
 42. Zvetkova I, Apeidaile A, Ramsahoye B, Mermoud JE, Crompton LA, *et al.* Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. *Nat Genet* 2005; 37:1274-1279.
 43. Dahlhoff M, Pfister S, Blutke A, Rozman J, Klingenspor M, *et al.* Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842:304-317.