

生活習慣病における脂肪細胞の意義と大豆たん白質の効果  
体脂肪分布と脂肪細胞機能, 特にアディポサイトカイン分泌に及ぼす大豆たん白質の影響 (第二報)

松澤佑次\*

大阪大学大学院医学系研究科

**The Multivariate Functions of Adipose Tissue and the Metabolic Syndrome:  
The Effects of Soybean Protein on Fat Distribution and Adipocytokines**

Yuji MATSUZAWA

Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871

ABSTRACT

The metabolic syndrome, a cluster of insulin resistance, hypertension and dyslipidemia, is a common basis of Type 2 diabetes and atherosclerotic vascular diseases in industrialized countries. The most common cause of the metabolic syndrome is the accumulation of intra-abdominal visceral fat. Adipose tissue secretes a variety of bioactive substances called adipocytokines. Dysregulation of adipocytokines by overnutrition may play an important role in the development of the metabolic syndrome. Soybeans, a part of the Japanese traditional diet, may protect against the development of the metabolic syndrome through regulation of adipocytokines. This study was aimed to clarify 1) the role of adipocytokines in the development of the metabolic syndrome, and 2) the significance of soybean protein, on the regulation of adipocytokines. Adiponectin is an adipose-specific plasma protein, which we identified in the Human Adipose cDNA Project. Adiponectin possesses the activities to suppress the expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells; the expression of scavenger receptor mRNA in macrophages; and growth factor-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. Furthermore adiponectin promotes glucose uptake in myocytes. Therefore, adiponectin may play a key role in the development of the metabolic syndrome. In previous studies, we reported dysregulation of adiponectin in subjects with body fat accumulation. In the present study, we investigated 1) the role of adiponectin in the metabolic syndrome using mice lacking the adiponectin gene and mice overexpressing adiponectin, and also studied 2) the effect of a soy protein diet on adiponectin concentrations. Adiponectin knockout mice exhibited severe insulin resistance when fed a high-fat, high-sucrose

\* 〒565-0871 吹田市山田丘2-2

diet. The knockout mice also showed severe vascular neointimal thickening from vascular injury. Overexpression of adiponectin in the apoE knockout mice, which is an animal model for atherosclerosis, significantly reduced fatty streak lesions in aorta. In obese KK-Ay mice, body fat weights, plasma cholesterol, triglyceride, free fatty acid, and glucose levels were lower in mice on a calorie-restricted diet containing soy protein isolate. Among the genes related to glucose and fatty acid metabolism, adiponectin mRNA levels in adipose tissue and adiponectin plasma concentrations were elevated in mice on calorie-restricted diets, although there were no significant differences between soy protein and casein protein groups. Our results indicate that adiponectin has anti-atherogenic and anti-diabetic activity in vivo, and a calorie-restricted diet elevates plasma adiponectin concentration in obesity. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 1-10, 2003.

Key words : soy protein, adipocytokines, adiponectin, metabolic syndrome, visceral fat

糖尿病や動脈硬化疾患は、現在の我が国で、国民の生活の質や医療財政に大きな影響を与えている重要な疾患である。糖尿病は動脈硬化疾患のリスクが高く、最終的には動脈硬化疾患に陥ることにより生命予後が左右される。最近、耐糖能異常、高血圧症、脂質代謝異常を合併するマルチプルリスクファクター集積状態が頻度の高い動脈硬化発症基盤として認識されるようになったが、この中でも偶然に糖尿病、高血圧症、脂質代謝異常が合併するのではなく、上流に共通の発症基盤が存在する病態が、「メタボリックシンドローム」と呼ばれ注目されている。近年の我が国や欧米諸国においてこのような病態が急増している社会背景を考えると、過栄養や運動不足による体脂肪蓄積、即ち肥満がメタボリックシンドロームの上流因子として重要と考えられるが、私達はCTスキャンを用いた体脂肪分布解析により、体脂肪絶対量ではなく腹腔内臓脂肪の蓄積が病態発症に深く関与しており、軽度肥満であってもメタボリックシンドロームの病態を示すことを明らかにしてきた。

内臓脂肪蓄積による病態発症の根底には食生活の変化があり、今まさに量的のみでなく質的に日本固有の食文化を見直すときがきたといえる。大豆たん白質は旧来の日本食たん白質源として重要であり、コレステロール低下効果、脂肪合成抑制効果、抗肥満効果などが知られている。しかし、実際大豆たん白質が体脂肪に如何なる影響を与え、糖尿病や動脈硬化疾患の予防にどのように繋がるかは分子レベルでの検討が充分に行われているとはいえない。

脂肪細胞は従来、単なるエネルギー備蓄細胞とのみ捉えられていたが、最近の分子生物学的研究の進歩に

より、多彩な生理活性物質（アディポサイトカインと呼ぶ）を合成、分泌する巨大な内分泌細胞でもあることが明らかになってきた。

そこで本研究では1) 脂肪細胞発現遺伝子、特にアディポサイトカインの機能を明らかにし、2) 過栄養による脂肪蓄積、特に内臓脂肪蓄積によりこれらに如何なる調節異常がおこって動脈硬化や糖尿病の基盤となるメタボリックシンドローム発症に結びつくのか、3) さらに大豆たん白質の摂取がアディポサイトカインにどのような影響を及ぼし代謝に好効果を与えるかを明らかにしようとするものである。昨年度は新規脂肪細胞発現遺伝子の同定と、脂肪細胞発現遺伝子の調節機構について報告し、さらに大豆たん白質の効果に関する予備実験について報告したが、本年度は、特に私達が発見しその機能解析を進めているadiponectinの個体レベルでの機能解析の結果を示し、さらに大豆たん白質を含むダイエット食がadiponectinに与える影響について報告する。

## 方 法

### Adiponectinノックアウトマウスの解析

これまで私達が発見した脂肪細胞特異的な分泌因子、adiponectinがin vitroにおいて抗動脈硬化作用を有し、インスリン抵抗性とも関連することを報告してきた。adiponectinの生体内での生理的作用をより明確にする目的でノックアウトマウス (KO) を作成し解析を行った。マウスadiponectin遺伝子の開始コドンを含むExon 2をネオマイシン耐性遺伝子で置換しgene targetingを行った。キメラマウスをC57BL/6Jと交配

して得られたヘテロマウスを、C57BL/6Jに5世代バッククロスをかけてホモマウスを作成した。脂肪組織mRNAレベルおよび血中たん白質レベルにおいて、adiponectinは完全に欠損していた。

糖代謝、脂質代謝に関わる遺伝子発現をNorthern blotにて検討した。普通食下、high fat/high sucrose (HF/HS) 食下における血糖、インスリン値およびinsulin tolerance testによりインスリン抵抗性の評価を行った。さらにインスリン・シグナルについて検討した。培養筋肉細胞のモデルとしてC2C12 myocyteを用い糖取込みに対するadiponectinの効果を検討した。血管障害に対するKOの反応を検討した。大腿動脈をカテーテルワイヤーで擦過し、擦過後2週間の新生内膜増殖をHE染色標本において観察した。

### Adiponectin過剰発現マウスの解析

粥状動脈硬化のモデルであるアポリポたん白質Eホモ欠損マウス(12週齢、雄)に、ヒトadiponectin又は対照として $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する組み換え型アデノウイルス(Ad-APN又はAd- $\beta$ gal:  $2.2 \times 10^8$  PFU)を尾静脈より投与し、粥状動脈硬化形成に対するadiponectinの効果を検討した。

アデノウイルス投与14日後に摘出した大動脈起始部の切片でoil red O染色を施行後、同部に形成された粥状動脈硬化巣の面積および泡沫細胞内の脂肪滴径を計測した。血管壁におけるアデノウイルス由来ヒトadiponectinの局在を免疫染色で検討した。胸部大動脈から抽出したRNAを用い、定量的RT-PCR法による動脈硬化関連遺伝子発現レベルを検討した。

### 大豆たん白質を含むダイエット食が肥満マウスの脂肪組織遺伝子発現に与える影響

大豆たん白質を含むカロリー制限食が脂肪分布、脂質代謝、糖代謝および脂肪組織遺伝子発現やサイトカイン分泌に与える影響を見るために、マウスを高脂肪食で飼育後、大豆食またはカゼインを含む食事を与え、その効果を検討した。

肥満形成モデルとしてKK-Ayマウスを用い、4週間の肥満食で飼育後3群に分け、1群はInitial群として解剖、残り4群のうち、他の2群は、それぞれ大豆たん白質、カゼインをベースとしたダイエット食でさらに2週間飼育し、体脂肪量、腸管膜脂肪量、血糖値、脂肪組織由来因子、adiponectin濃度を比較検討した。

### 大豆たん白質食とカゼイン食の比較検討

植物性たん白質である大豆たん白質と動物性たん白質であるカゼイン食の差異をさらに明確にするため以下の実験を行った。6周齢のWistarラットを1週間の通常食で代謝を安定化後、23.5%大豆たん白質、また

は22.4%カゼインを含む食餌を10日間与え、血中adiponectin濃度に及ぼす影響を検討した。

## 結 果

### Adiponectinノックアウトマウスの解析

adiponectinは私達がヒト脂肪組織発現遺伝子の網羅的解析過程で見出した新規分泌たん白質で、正常ヒト血中に5-10  $\mu$ g/mLの濃度で存在するが、肥満、特に内臓脂肪蓄積時に血中濃度は低下する。これまでin vitroの実験系で本分子が、血管内皮細胞の接着分子発現や、種々のgrowth factorによる血管平滑筋細胞増殖、マクロファージにおけるスキャベンジャー受容体発現などを抑制し、いわゆる抗動脈硬化作用を有することを明らかにしてきた。さらに血中adiponectin濃度はインスリン感受性と良く相関し、その低下がインスリン抵抗性とも関連することを報告してきた。そこで本分子の生体における役割をより明確にするために、KOを作成し解析を行った。

まず、糖脂質代謝に関わる遺伝子発現をNorthern blotにて検討した。KOの骨格筋において、FFAの細胞内取り込みに関わるFATP-1遺伝子発現が著明に減少していた(Fig. 1a)。脂肪組織および肝臓におけるFATP-1遺伝子発現および他のFATPアイソフォーム(FATP-2~5)には変化がなかった。また、adipogenic marker geneであるPPAR $\gamma$ やleptinには野生型(WT)と差は見られなかった。インスリン抵抗性惹起因子である脂肪組織TNF- $\alpha$ 遺伝子発現および血中濃度が、db/dbマウスほどではないが、KOはWTの約5倍に増加していた(Fig. 1b)。

fat loading testを行ったところ、KOにおいて血中FFAクリアランスが遅延していることが明らかとなった(Fig. 1b)。これはKOの骨格筋におけるFATP-1遺伝子発現低下が一因と考えられた。

普通食下ではKOは血糖値、インスリン値はWTと差はなく、insulin tolerance testにより評価したインスリン感受性にも有意な差は見られなかったが、インスリン抵抗性を惹起するhigh fat/high sucrose (HF/HS)食を負荷したところ、KOの血糖、インスリン、FFA値は、WTよりも高値を呈し、glucose tolerance testから算出したinsulin resistance indexおよびinsulin tolerance testによりKOはより強いインスリン抵抗性状態にあることが明らかとなった(Fig. 1c, Fig. 2a)。さらにインスリン・シグナルをみると、骨格筋のIRS-1-associated PI3-kinase活性がKOで有意に低下していた(Fig. 2b)。なお、骨格筋IRS-2-associated PI3-

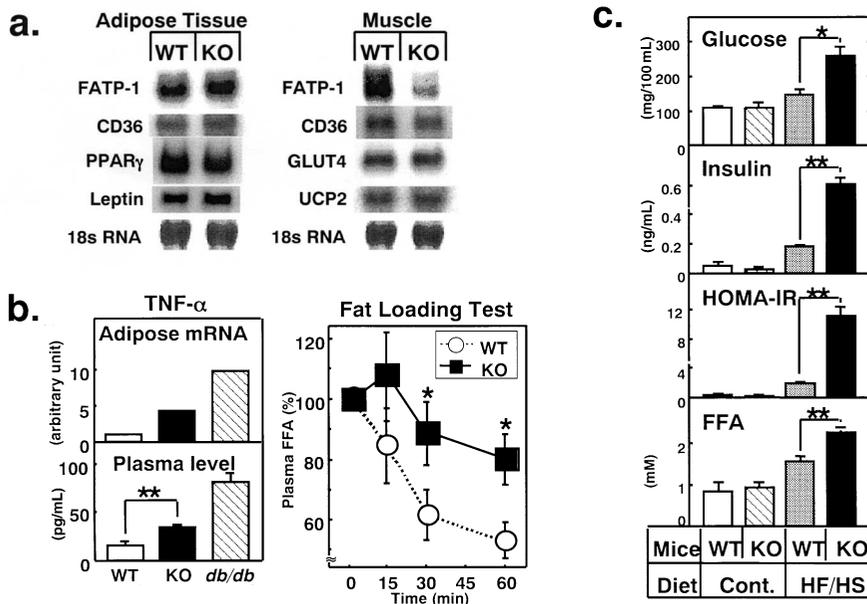


Fig. 1. Gene expression profile, glucose and fatty acid metabolism in adiponectin knockout mice. a. Gene expression in adipose tissue and muscle of wild type (WT) and adiponectin knockout (KO) mice. b. Adipose expression and plasma level of TNF $\alpha$ . c. Plasma glucose level, insulin level, HOMA-IR and FFA level of WT and KO mice fed control diet (Cont.) or high fat/high sucrose diet (HF/HS). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01.

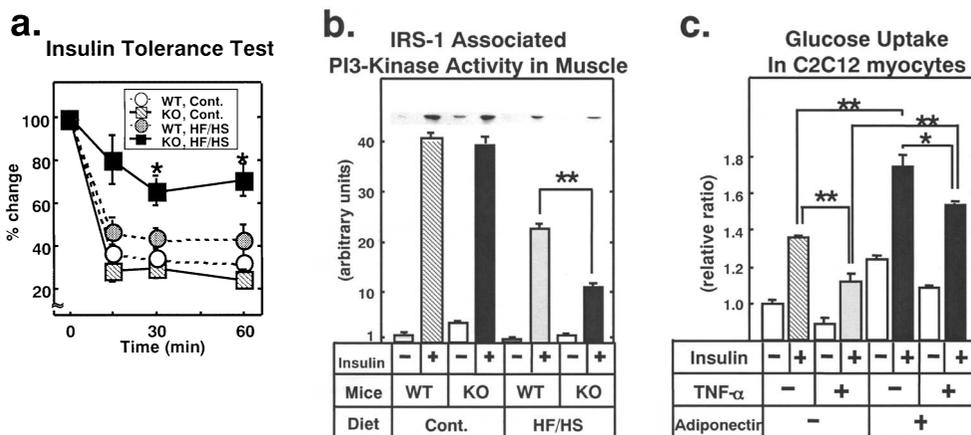


Fig. 2. Insulin sensitivity of adiponectin KO mice and effect of adiponectin on glucose uptake in myocytes. a. Insulin tolerance test in WT and KO mice under Cont. or HF/HS diet. b. IRS-1 associated PI3-kinase activity in muscles of WT and KO mice under Cont. or HF/HS diet. c. Effects of TNF $\alpha$  and adiponectin on glucose uptake by C2C12 myocytes. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01.

kinase活性および肝臓のIRS-1, 2-associated PI3-kinase活性はWTと差は認めなかった。以上より、このKOの食餌誘導性インスリン抵抗性の責任臓器は骨格筋であることが考えられた。そこでC2C12 myocyteを用いた実験を行った。adiponectinはFATP-1遺伝子発現を増加させ、またIRS-1-associated PI3-kinase活性およびGlucose uptakeを上昇させた (Fig. 2c)。

つぎに血管傷害に対するKOの反応を検討した。大腿動脈を擦過後2週間のHE染色標本において、KOではWTに比して新生内膜増殖が有意に亢進していた (Fig. 3a)。そして、このKOで観察された血管傷害後の強い新生内膜増殖はアデノウイルスを用いたadiponectin発現により抑制され、I/M ratioも有意にcontrol levelにまで改善された (Fig. 3b)。

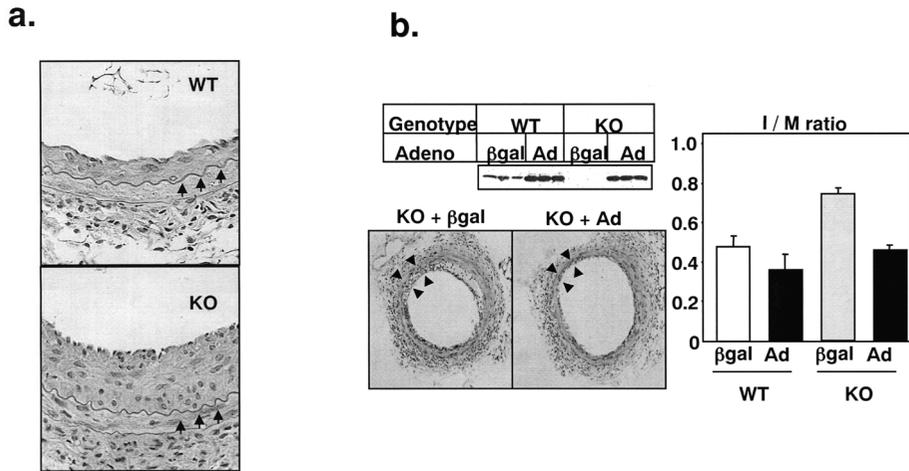


Fig. 3. Vascular neointimal thickening induced by vascular injury. a. Neointimal thickening in WT and adiponectin KO mice. b. Suppression of neointimal thickening by adenovirus mediated expression of adiponectin. (I/M; intima/media thickness ratio).

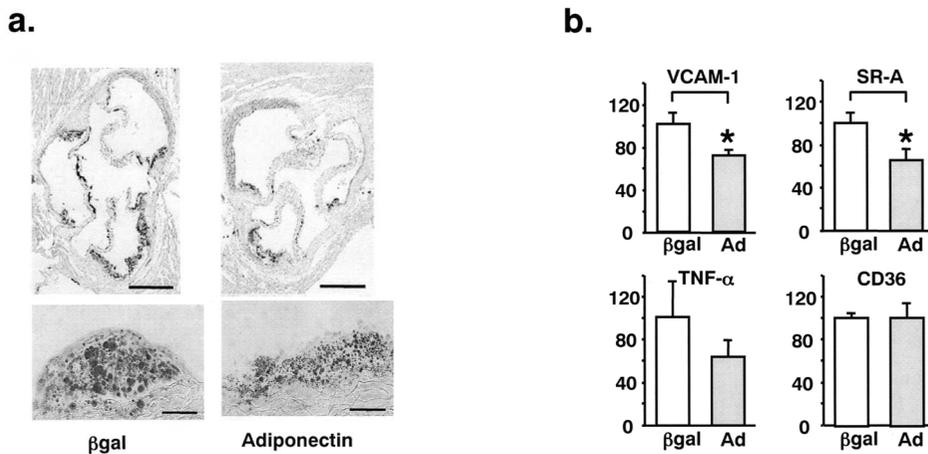


Fig. 4. Reduction of atherosclerotic lesions in apoE knockout mice by overexpression of adiponectin. a. Sections of supravallular aorta (lower panels; higher magnification). b. Gene expression in aorta of  $\beta$ gal or adiponectin expressing apoE KO mice. \* $P < 0.05$ .

### Adiponectin過剰発現マウスの解析

adiponectin KOマウスにみられた新生内膜肥厚は、ヒト粥状動脈硬化とは異なる病変で、冠動脈形成術後の再狭窄病変に近い。そこで粥状動脈硬化により近い病変をきたすモデル動物であるアポリポたん白質Eホモ欠損マウスに、組み換え型アデノウイルスを用いてadiponectinを高発現し、粥状動脈硬化形成に対するadiponectinの効果を検討した。

本実験ではヒト型adiponectinを発現する系を用いた。Ad-APN投与マウスでは、ヒトadiponectin血中濃度は、投与5日後には対照マウスの内因性adiponectinの約50倍に上昇した。脂質代謝および糖代謝パラメー

ターには有意な変化は認めなかった。アデノウイルス投与14日後に摘出した大動脈起始部の切片でoil red O染色を施行後、同部に形成された粥状動脈硬化巣の面積および泡沫細胞内の脂肪滴径を計測した。Ad-APN投与マウスの粥状動脈硬化巣の面積は、対照と比較し約30%抑制され、adiponectinが粥状動脈硬化の進展を抑制することが明らかになった (Fig. 4a)。また、Ad-APN投与マウスの粥状動脈硬化巣に存在する泡沫細胞内の脂肪滴径は、対照と比較し有意に減少し (Fig. 4a)、adiponectinがマクロファージの泡沫化を抑制することが示唆された。Ad-APN投与マウスの大動脈起始部切片の免疫染色では、アデノウイルス由来ヒトadiponectin

は、Mac-1抗体（マクロファージ認識抗体）陽性かつ $\alpha$ -actin抗体（血管平滑筋認識抗体）陰性の泡沫細胞の局在に一致して集積し、マクロファージを主体とする粥状動脈硬化巣局所に直接作用していると考えられた。

胸部大動脈から抽出したRNAを用い、定量的RT-PCR法による動脈硬化関連遺伝子発現レベルを検討したところ、Ad-APN投与マウスでは、対照に比較しVCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) は34%、SR-A (Class A Scavenger Receptor) は29%と有意に低下、TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) は低下傾向を示し (Fig. 4b)、adiponectinが生体においても血管内皮の接着分子、スカベンジャー受容体、炎症性サイトカインの発現をそれぞれ抑制することが明らかになった。

#### 大豆たん白質ダイエット食がadiponectinに与える影響

以上のようにadiponectinは抗動脈硬化、インスリン抵抗性防御作用をもつメタボリックシンドロームのキー分子と考えられた。そこで大豆たん白質を含むカロリー制限食が脂質代謝、糖代謝およびadiponectinに与える影響を見るために、肥満モデルマウスであるKK-Ayマウスを用い検討した。

5週齢のKK-Ayマウスを標準食 (CRF-1) で1週間飼育し、代謝状態を安定させた後、さらに4週間の肥満食で飼育し3群に分けた。1群はInitial群として解剖、残り4群のうち、他の2群は、それぞれ大豆たん白質、カゼインをベースとした総カロリーを60%に減じたダイエット食 (SPI群、カゼイン群) でさらに2週間飼育し、比較検討した。

体重、総脂肪量、肝臓重量および腸間膜、精巣周囲の脂肪組織重量は、Initial群と比較し、SPI群、カゼイン群で低値であった (Table 1)。総脂肪量はカゼイン群に比し、SPI群でより低値であった。平均腸間膜

脂肪組織重量、肝中性脂肪含量はカゼイン群よりSPI群で低値であったが、有意差は得られなかった。血漿コレステロール値、中性脂肪値、血糖値、インスリン値、遊離脂肪酸レベルはInitial群より、SPI群、カゼイン群において低値で、特に血糖値はカゼイン群 (232 $\pm$ 23 mg/100 mL) に比べSPI群 (170 $\pm$ 14 mg/100 mL) とさらに低値であった (Fig. 5)。

脂肪代謝関連遺伝子群 (UCP-1, CD36, aP2, acyl CoA oxidase, PPAR $\gamma$ , fatty acid synthase)、糖代謝関連遺伝子群 (PPAR $\gamma$ , phosphoenolpyruvate carboxykinase, insulin receptor substrate 1, 2, glucose transporter 1, 4, adiponectin) の遺伝子発現を検討した (Fig. 6)。脂肪組織におけるadiponectin遺伝子発現はカロリー制限食群 (SPI群、カゼイン群) でInitial群に比べ、亢進していた。

そこで各群における血中adiponectin濃度をウエスタン法により解析した。血中adiponectin濃度は、カロリー制限食群 (SPI群、カゼイン群) がInitial群に比べ高値を示した (Fig. 7a)。平均adiponectin濃度はカゼイン群より、さらにSPI群で高値であったが、両群で有意差は得られなかった。

#### 大豆たん白質食とカゼイン食の比較検討

上記の実験では肥満動物に大豆たん白質を含むダイエット食を与えることにより、抗動脈硬化、抗糖尿病作用を有するadiponectinの脂肪組織における発現が亢進し、血中濃度も増加することが明らかになったが、植物性たん白質である大豆たん白質食と動物性たん白質であるカゼイン食との差は明らかではなかった。これは減量が脂肪組織に与える影響が前面に出たものと考えられる。本研究の目的は大豆たん白質食が脂肪組織にどのような影響を与えメタボリックシンドロームを予防しうるかを明らかにすることであるので、非肥

Table 1. Effects of soy protein diet on body weight and body composition of KK-Ay mice

		Initial	Casein diet	SPI diet
Body weight	(g)	47.2 $\pm$ 0.6	37.3 $\pm$ 0.5 <sup>b*</sup>	36.7 $\pm$ 0.5 <sup>b*</sup>
Body water	(%)	57.2 $\pm$ 1.0	58.7 $\pm$ 0.3	59.4 $\pm$ 0.7
Body fat	(%)	26.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	23.5 $\pm$ 0.3 <sup>b*</sup>	21.9 $\pm$ 0.5 <sup>b**</sup>
Body protein	(%)	14.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	15.6 $\pm$ 0.3 <sup>b*</sup>	15.9 $\pm$ 0.3 <sup>b*</sup>
Liver	(g)	2.73 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.04 <sup>b*</sup>	1.41 $\pm$ 0.02 <sup>b*</sup>
Hepatic cholesterol	(mg/g)	5.20 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	3.65 $\pm$ 0.19 <sup>b*</sup>	3.32 $\pm$ 0.45 <sup>b*</sup>
Hepatic triglyceride	(mg/g)	204.3 $\pm$ 14.3 <sup>a</sup>	10.0 $\pm$ 1.2 <sup>b*</sup>	6.9 $\pm$ 1.7 <sup>b*</sup>
Mesenteric WAT	(g)	1.20 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.03 <sup>b*</sup>	0.68 $\pm$ 0.05 <sup>b*</sup>
Epididymal WAT	(g)	1.49 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.05 <sup>b*</sup>	0.96 $\pm$ 0.07 <sup>b*</sup>
BAT	(g)	0.686 $\pm$ 0.041 <sup>a</sup>	0.525 $\pm$ 0.023 <sup>b*</sup>	0.532 $\pm$ 0.023 <sup>b*</sup>
Soleus muscle	(g)	0.109 $\pm$ 0.008	0.128 $\pm$ 0.007	0.122 $\pm$ 0.003

SPI, soy protein isolate; WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue. a, b,  $P < 0.05$ , a vs b by Tukey's HSD; \* $P < 0.05$ , vs high fat diet group by student t test; #  $P < 0.05$  casein group vs SPI group.

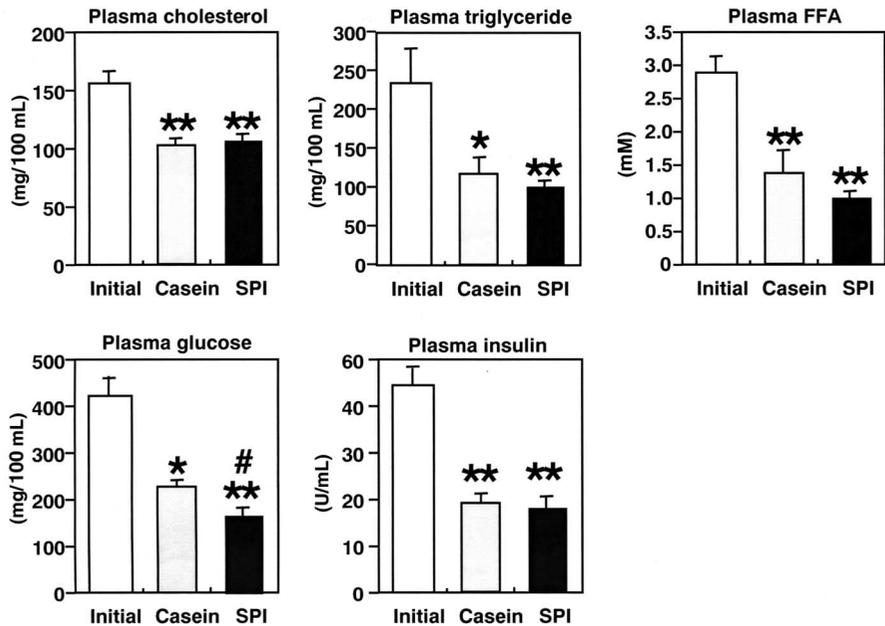


Fig. 5. Metabolic profiles of KK-Ay obese mice before and after calorie restricted diet containing casein or soy protein isolate (SPI). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$  casein group vs SPI group.

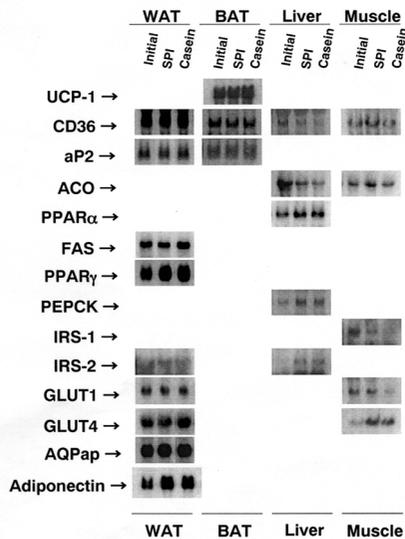


Fig. 6. Effect of soy protein diet on mRNA expression in KK-Ay mice. WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.

満動物に正常の發育環境下で大豆たん白質，またはカゼインを含む食餌を与え，それぞれが血中adiponectin濃度に与える影響を検討した。

大豆たん白質食，カゼイン食下でWistarラットは正常に發育し，体重は両群で差を認めなかった。肝臓お

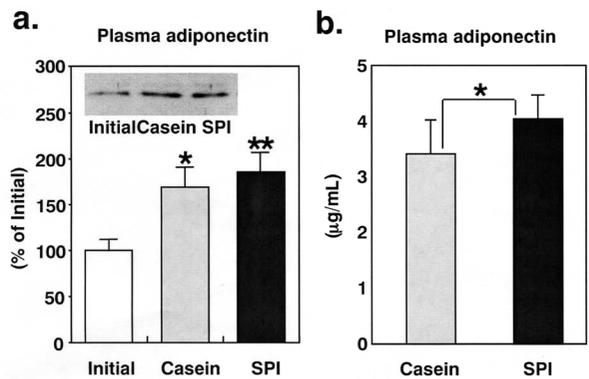


Fig. 7. Effects of soy protein diet on plasma adiponectin levels. a. Effects of calorie restricted diet containing casein or soy protein isolate (SPI) in KK-Ay obese mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Initial group b. Effects of casein or soy protein isolate (SPI) diet in Wistar rats. \* $P < 0.05$ .

よび脂肪組織重量はカゼイン食群に比し大豆たん白質食群で低値であった。血中adiponectin濃度は大豆たん白質食群の方が高値であった (Fig. 7b)。

## 考 察

近年、動脈硬化性疾患発症の基盤として、耐糖能異常、高脂血症、高血圧を同一個人に合併するマルチプルリスクファクター症候群が注目されている。マルチプルリスクファクター症候群では危険因子が集積することにより動脈硬化発症のリスクが著しく高い。耐糖能異常、高脂血症、高血圧はそれぞれ頻度の高い病態であるため、それぞれが偶然個人に重なることもあるが、そうではなくマルチプルリスクファクターの集積に共通の上流の発症基盤をもつ病態があると想定されるようになり、メタボリックシンドロームと呼ばれ注目されている。メタボリックシンドロームは糖尿病、高血圧、高脂血症として診療されている患者の一部にも含まれており、他のリスクを合併しており、動脈硬化性疾患発症の危険性が非常に高い。インスリン抵抗性という共通した症状を伴っているためインスリン抵抗性症候群とも呼ばれる。メタボリックシンドロームの上流因子や発症の分子機構については、不明な点も少なくないが、すべてではないにしても過栄養、運動不足による腹腔内臓脂肪蓄積がかなり重要な位置を占める。私達は脂肪組織発現遺伝子の包括的解析により、この組織が単なるエネルギー貯蔵臓器ではなく、アディポサイトカインと呼ぶ様々な生理活性物質を分泌する内分泌臓器でもあることを明らかにしてきた。

一方、これまで本邦においては動脈硬化性疾患の発症頻度は欧米に比べて低く、この背景の一つとして旧来の日本食が動脈硬化に対し防衛的に働くと考えられていた。この中でも肉食を避けてきた我が国では、たん白質源として植物性たん白質である大豆たん白質を摂取してきたことが注目される。実際大豆たん白質食が血清コレステロール低下効果、脂肪合成抑制効果、抗肥満効果などを有することが報告されており、動脈硬化疾患の危険因子を軽減することにより予防効果を示す可能性がある。本研究では脂肪組織に焦点をあて、脂肪組織発現遺伝子の発現異常がメタボリックシンドローム発症に如何に関わっているかを解析し、さらに大豆たん白質食がこれら脂肪組織発現遺伝子発現にどのような変化を及ぼすかを明らかにすることによって、メタボリックシンドロームの予防効果、ひいては動脈硬化疾患の予防に繋がるかを検討した。

昨年度の研究では新規脂肪細胞発現遺伝子の同定とともに、私達が注目している新規脂肪細胞分泌因子 adiponectin がマクロファージの泡沫化抑制などの抗動脈硬化作用を有すること、adiponectin や脂肪細胞グリ

セロールチャネル分子アクアポリンAディポースの調節機構について報告し、肥満マウスに大豆たん白質を含むダイエット食を与えることにより、体重、脂肪組織量が減少し、血清脂質値や血糖値が改善することを報告した。本年度は、adiponectin の抗動脈硬化作用、抗糖尿病作用についてノックアウト (KO) マウスや過剰発現マウスを用いて証明するとともに、大豆たん白質食が adiponectin に与える影響について検討した。

adiponectin についてはこれまで *in vitro* の実験系において、血管内皮細胞の接着分子発現、マクロファージのスキベンジャー受容体発現、血管平滑筋の細胞増殖を抑制し、抗動脈硬化作用を有することを報告してきた。また血中濃度はグルコースクランプ法で測定したインスリン感受性と相関し、血中濃度低下がインスリン抵抗性に結びつく可能性を示してきた。従って本分子を遺伝的に欠損するノックアウトマウスはメタボリックシンドロームのモデルマウスになることが予想される。adiponectin KO マウスは通常食下では耐糖能は正常であったが、高脂肪高ショ糖食負荷により、野生型より強いインスリン抵抗性を示した<sup>1)</sup>。また血管傷害に対してもより強い血管内膜肥厚を示し<sup>2)</sup>、このマウスが環境負荷により病態をきたす生活習慣病のモデルとなることが証明された。この結果からも adiponectin が生体侵襲に対する防御因子であり、過栄養負荷による分泌不全が生活習慣病の発症に関わることが明らかとなった。ヒトにおいても adiponectin 遺伝子の変異解析により、血中濃度低下を伴うミスセンス変異が見出されており、このような変異を伴う症例ではメタボリックシンドロームの諸病態を呈し、高率に動脈硬化疾患を発症することが明らかになっている<sup>3)</sup>。血管内膜増殖は傷害局所での PDGF 等のサイトカイン放出により、中膜の平滑筋細胞が内膜へと遊送、増殖し、またコラーゲン等の線維たん白質を合成することによりおこるが、adiponectin は種々の増殖因子の共通シグナルである MAPkinase の経路を抑制し、過剰な反応が起こらないように調節している<sup>4)</sup>。内膜における KO マウスにみられる血管内膜肥厚は、アデノウイルスを用いた adiponectin 過剰発現により抑制されたが、粥状動脈硬化病変とは異なるので、粥状動脈硬化のモデルマウスであるアポE KO マウスに adiponectin を過剰発現することによって病変の進展が抑制しうるかを検討した。adiponectin 過剰発現マウスの粥状動脈硬化巣の面積は、対照と比較し約 30% 抑制された<sup>5)</sup>。過剰発現により血中濃度は対照マウスの約 50 倍に上昇したが、糖代謝パラメーターには有意な変化は認めなかった。正常インスリン感受性をもつマウスには adiponectin を過剰

発現しても影響がないことが示され、粥状動脈硬化の進展抑制はインスリン感受性の増強を介するものではない。adiponectinは泡沫細胞の局在に一致して集積しており、マクロファージがadiponectin受容体を高発現している可能性がある。大動脈における動脈硬化関連遺伝子発現レベルを検討したところ、adiponectin過剰発現マウスではVCAM-1, Class A Scavenger Receptor発現が抑制されており、in vitroでみられた抗動脈硬化作用が生体においても駆動していると考えられる。adiponectinは本来脂肪細胞分化を抑制する働きを有しているが<sup>6)</sup>、内臓脂肪蓄積がおこると分泌不全がおこり、血中濃度が低下しインスリン抵抗性や動脈硬化を独立して生じさせるものと考えられる。血中adiponectin濃度が高い集団では、糖尿病や動脈硬化疾患の発症が抑えられているという成績も出てきている<sup>7,8)</sup>。

このように抗動脈硬化作用が生体においても証明されたadiponectinの血中濃度は内臓脂肪蓄積時には低下しているが、大豆たん白質によるダイエット食がadiponectinにどのような影響を与えるかを検討した。大豆たん白質によるダイエット食により体重、脂肪組織重量、肝臓重量は減少し、血清コレステロール値、トリグリセライド値、血糖値は改善した。脂肪組織

adiponectin mRNA発現は増加し、血中濃度も有意に増加した。平均血中adiponectin濃度は動物性たん白質であるカゼインを含む食餌を与えた群よりも大豆たん白質によるダイエット食群の方が高値であったが両群で有意差は得られなかった<sup>9)</sup>。これはカロリー制限が脂肪組織遺伝子発現に与える影響が大きいため、含まれるたん白質成分（大豆たん白質とカゼイン）の効果をマスクしている可能性がある。そこで定常カロリーでたん白質成分を大豆たん白質とカゼインのみ変え、2群で効果を検討した。すると血中adiponectin濃度は、カゼイン群より大豆たん白質群の方が高値であった。つまり大豆たん白質には血中adiponectin濃度を上昇させる効果があると考えられる。大豆たん白質が血中adiponectin濃度を増加させる機序は明らかではない。androgenは脂肪細胞からのadiponectin分泌を抑制する<sup>10)</sup>。大豆たん白質抽出物には女性ホルモン様作用を示す成分が含まれているとされており、このような成分が脂肪細胞からのadiponectin分泌を促進するのかもしれない。今後、脂肪組織発現遺伝子レベルで大豆たん白質食が如何なる変化を与えるか、また大豆たん白質食に含まれるどのような成分が脂肪組織発現遺伝子を変化させるかを検討する予定である。

## 要 約

本研究の目的は生活習慣病、特に動脈硬化疾患の分子機構を脂肪組織遺伝子発現異常の観点から明らかにし、大豆たん白質食が如何なる影響を与えるかを明らかにすることである。今年度は私達が発見したadiponectinが抗動脈硬化作用を有することをノックアウトマウスや過剰発現マウスを用いて明らかにし、本分子の欠損マウスが生活習慣病のモデルマウスであることを示した。大豆たん白質を含む食餌はカゼイン食と比べて血中adiponectin濃度を増加させた。

## 文 献

- 1) Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T and Matsuzawa Y (2002): Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*, **8**, 731-737.
- 2) Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, Kumada M, Okamoto Y, Nagaretani H, Nishizawa H, Kishida K, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Nagai R, Funahashi T and Matsuzawa Y (2002): Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem*, **277**, 37487-37491.
- 3) Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kawamoto T, Sumitsuji S, Funahashi T and Matsuzawa Y (2002): Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, **51**, 2325-2328.
- 4) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Shimomura I,

- Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T and Matsuzawa Y (2002): Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation*, **105**, 2893-2898.
- 5) Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T and Matsuzawa Y (2002): Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, **106**, 2767-2770.
- 6) Yokota T, Meka CS, Medina KL, Igarashi H, Comp PC, Takahashi M, Nishida M, Oritani K, Miyagawa J, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y and Kincade PW (2002): Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest*, **109**, 1303-1310.
- 7) Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC and Krakoff J (2002): Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*, **360**, 57-58.
- 8) Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Buemi M, Nicocia G, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T and Matsuzawa Y (2002): Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 134-141.
- 9) Nagasawa A, Fukui K, Funahashi T, Maeda N, Shimomura I, Kihara S, Waki M, Takamatsu K and Matsuzawa Y (2003): Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res*, **34**, 635-639.
- 10) Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T and Matsuzawa Y (2002): Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*, **51**, 2734-2734.