

**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（第三報）**

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 (Part III)**

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 industrial countries. The most common cause of the metabolic syndrome is 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. The Japanese traditional diet may protect against the development of the metabolic syndrome. 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, one of the major components of Japanese traditional diet, on the regulation of adipocytokines. In the previous reports, we demonstrated that adiponectin, which we discovered in adipose cDNA project, possessed anti-atherosclerotic properties, but its plasma concentration was decreased in visceral fat obesity. Calorie-restricted diet containing soy protein could raise plasma adiponectin in diet-induced obesity. In this final report, we describe a global function of this adipocyte-derived factor and the effect of soy protein diet on the regulation of adipocytokines. In adiponectin knockout mice, we found that CRP and TNF α mRNAs were overexpressed in the adipose tissue. Highly sensitive Plasma CRP level was correlated negatively with plasma adiponectin level in humans. Adiponectin-null mice also showed severe hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride. Overexpression of adiponectin suppressed hepatic fibrosis via inhibition of smad 2 signaling. High plasma adiponectin level was a negative risk for breast cancer. In mouse tumor model, injection of adiponectin inhibited the tumor

* 〒565-0871 吹田市山田丘2-2

growth. These data indicate that adiponectin has multivalent functions including anti-inflammatory, anti-fibrosis and anti-tumor activities, and that the reduction of adiponectin may have a causative role in inflammation, hepatic fibrosis and some types of cancer frequently associated with visceral obesity. Soy protein diet suppressed the expression of type 1 plasminogen activator inhibitor mRNA and induced mRNA expression and plasma concentration of adiponectin as compared to the casein diet without affecting the body weight. However, we did not observe any significant change in plasma adiponectin level after the ingestion of the formula containing 20 g soy protein per day for 12 weeks. Our results indicate that adiponectin has multivalent functions and that the reduction of adiponectin may play an important role in the development of the disorders in visceral obesity. Soy protein diet has potential beneficial effect on adiponectin. However, further clinical studies will be necessary. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 1-12, 2004.

Key words: soy protein, adipocytokine, viscera fat, adiponectin, metabolic syndrome

メタボリックシンドロームは、高血糖、高脂血症、高血圧が個人に合併する状態で、もともとはシンドロームXと呼ばれた動脈硬化疾患の易発症状態である。いわゆるマルチプルリスクファクター症候群であるが、単にリスクが偶然重なったのではなく、上流に共通の発症基盤を持つ独立した病態として捉えられている。メタボリックシンドロームは特殊な病態ではなく、過栄養に傾く現代社会においてはむしろ最も一般的な動脈硬化疾患の基盤と考えられる。NCEP (National Cholesterol Education Program) やWHOの診断基準にもあげられているように、腹部脂肪蓄積はメタボリックシンドロームの上流因子として重要であるが、私達は腹部脂肪の中でも、皮下脂肪ではなく腸間膜や大網周囲に存在する腹腔内臓脂肪蓄積が病態発症に重要であることを明らかにしてきた。さらに最近では内臓脂肪蓄積は脂肪肝から脂肪肝炎 (Steatohepatitis) を経て肝線維症にいたる消化器疾患とも関連するといわれている。がんは動脈硬化疾患と並んで国民の生活の質と予後を左右する重要な疾患である。乳がん、大腸がんなどある種のがんもまた肥満に合併しやすいことが古くから知られており、これらも内臓脂肪蓄積と関連する可能性がある。このように過栄養状態に伴いやすい多くの疾患の上流に内臓脂肪蓄積が存在すると考えられる。

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、今一度日本固有の食文化を見直す必要がある。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、動脈硬化疾患抑制作用があるといわれている。しかし、そのような作用の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。私達は内臓脂肪蓄

積による病態発症の分子機構を明らかにするために、脂肪組織発現遺伝子の解析を行い、脂肪組織、特に内臓脂肪組織がアディポサイトカインと呼ぶ多彩な生理活性物質を分泌し、内臓脂肪蓄積時にはリスクが集積するのみでなく、PAI-1やHB-EGFなどの過剰分泌が直接血管に障害を与えることによって、さらに動脈硬化惹起性が高いことを示した。多彩なアディポサイトカインの分泌異常がメタボリックシンドロームを初めとする内臓脂肪蓄積時の複雑な病態の一因となっている可能性がある。そこで本研究では1) アディポサイトカインの中でも特に、私達が発見したアディポネクチンの機能を明らかにし、2) アディポネクチン分泌異常がどのような病態と結びつくのか、3) さらに大豆たん白質摂取がアディポサイトカイン、特にアディポネクチン分泌にどのような影響を及ぼすかを明らかにしようとするものである。これまでの研究により、アディポネクチンの抗動脈硬化、抗糖尿病作用や調節機構を明らかにし、大豆たん白質を含むダイエット食が血中アディポネクチン濃度を上昇させることを報告してきた。最終年度は、さらに多彩なアディポネクチンの作用と病態との関わりについて明らかにし、大豆たん白質食そのものが様々なアディポサイトカインや、特にアディポネクチン発現、分泌に与える効果について検討したので報告する。

方 法

アディポネクチンと炎症、血管内皮機能

冠動脈造影を行った連続101例 (年齢36~75才) について血中高感度CRP (Dade Behring社)、アディポ

ネクチン濃度（大塚製薬）を測定した。私達が樹立したアディポネクチン欠損マウス脂肪組織を採取し、SYBR Green I を用いたリアルタイムPCRによって、CRP、アディポネクチンの遺伝子発現量を検討した。値はGAPDH発現量によって補正した。

202例の軽度本態性高血圧症例において反応性血管充血と血中アディポネクチン濃度を測定した。糖尿病、腎不全症例などは除外した。300 mmHgのカフ圧による駆血前後の前腕血流量を、Horkkanson社製のStrain-gauge-plethysmographyにより測定し、その比を反応性血管充血比（reactive hyperemia ratio）とした。また0.3 mgのニトログリセリン舌下前後の前腕血流量を測定した。野生型およびアディポネクチン欠損マウスの胸部大動脈を摘出し、ノルエプネフリンにて最大収縮後、アセチルコリンまたはニトロプルシッドによる血管拡張反応を日本光電社製のisometric transducerを用いて測定した。培養ヒト臍静脈血管内皮細胞を用い、レコンビナント・アディポネクチン添加後のAMP kinase, Akt, 内因性一酸化窒素合成酵素（eNOS）のリン酸化反応を検討した。また牛大動脈内皮細胞を用いレコンビナント・アディポネクチン添加後のNO合成を、NO特異的蛍光色素を用い測定した。

アディポネクチンと肝線維症、がん

野生型およびアディポネクチン欠損マウスに、300 μ L/kg体重の四塩化炭素を週2回、12週投与し、組織学的に肝線維化を検討した。正常マウスに、アディポネクチンを高発現するアデノウイルスまたは対照としてLacZを発現するアデノウイルスを投与し、その後四塩化炭素で肝線維化を誘導した。両者の肝臓における α -smooth muscle actin陽性細胞（肝星細胞）数を比較検討した。培養肝星細胞を用い、PDGFにより誘導される増殖能（チミジン取り込み）、TGF- β 1により誘導されるcollagen 1 α 2発現、Smad2の核内移行を、レコンビナント・アディポネクチン添加の有無で検討した。

102例の乳がん患者と100例の正常対照において、血中アディポネクチン濃度を測定し、アディポネクチン濃度と乳がんリスクの関係をロジスティック解析により検討した。家族歴、閉経年齢、妊娠歴、体格指数（BMI）などの他の乳がんリスクを補正した。6～7週令のC57BL/6マウスT241線維肉腫細胞を移植後、腫瘍部位に50 μ g/日のアディポネクチンまたはPBSを注入し、2週間後に腫瘍サイズおよび腫瘍組織内のTunnel陽性アポトーシス細胞数を検討した。

大豆たん白質食がアディポネクチン発現、血中濃度に与える影響

5週齢雄性Wistarラットを1週間の通常食で代謝を

安定化後、23.5% soybean protein isolate（SPI群）、または22.4% caseinを含む食餌（Casein群）を10日間投与後、体重、摂餌量、血中コレステロール、中性脂肪値、血糖値、インスリン値、血中アディポネクチン濃度を測定した。肝臓、脂肪組織を摘出し、脂質含量を測定した。またmRNAを抽出し、代謝関連遺伝子やそれらをコントロールする転写因子発現、さらにアディポネクチンを含むアディポサイトカイン発現をリアルタイムPCRによって検討した。

健康成人20名を対象に大豆たん白質食が血中アディポネクチン量に与える影響を検討した。初回検査のうち、食事量や内容に極端な問題があれば修正を指導し、約4週間後、再び血中アディポネクチン濃度を測定した（試験前検査）。その後毎日、通常の食事に細粒状の精製大豆たん白質製品を1日25 g（大豆たん白質量として約20 g）日常の食事に添加、または白湯などで溶かして摂取するようにした。動物性たん白質は軽度制限するよう指導した。6週間後、12週間後の血中アディポネクチン濃度を測定した。

以上の臨床研究は大阪大学または共同研究施設の倫理委員会の承認を得、全ての症例に文書にて説明し同意のうえ行った。動物実験は大阪大学動物実験施設の基準にもとづき承認を得て行った。

結 果

アディポネクチンと炎症、血管内皮機能

メタボリックシンドロームは動脈硬化疾患の一般的な基礎病態であり、2型糖尿病の発症とも関連している。最近、動脈硬化疾患や2型糖尿病発症の基盤として炎症が注目されている。これにはhigh sensitive CRP（hsCRP）の測定が可能になったことが大きく関与している。しかし何故CRPがこれら2つの疾患と関連するかは明らかでない。血中hsCRP濃度とアディポネクチン濃度の関連を検討した（Fig. 1a）。血中hsCRP濃度はアディポネクチン濃度と負の相関関係を示した（ $r=0.29$, $P<0.01$ ）。しかし2つのパラメーターの因果関係は明らかではない。そこでアディポネクチンを一義的に欠損するノックアウトマウスにおけるCRPについて検討した。意外なことに脂肪組織にCRP mRNA発現が検出され、アディポネクチン欠損マウスではCRP発現量が増加していることが観察された（Fig. 1b左）。次にヒト脂肪組織におけるアディポネクチンおよびCRP mRNAの発現を検討した。両者は負の相関関係を示し、アディポネクチン発現の低い症例は、脂

肪組織CRP発現が増加していることが明らかになった (Fig. 1b右).

近年, メタボリックシンドローム症例で血管内皮機能異常が生じていることが注目されている. 血中アディポネクチン濃度と, 血管内皮機能との関係が深いとされている駆血後反応性血管拡張能との関係を検討し

た. 血中アディポネクチン濃度と駆血後反応性血管拡張能は正相関を示した ($r=0.26, P<0.01$) (Fig. 2a). 一方, 内皮に依存しないとされるニトログリセリン反応性血管拡張能とは相関しなかった. これらよりアディポネクチンが内皮依存性血管拡張反応に関連することが考えられた. そこでアディポネクチン欠損マウス

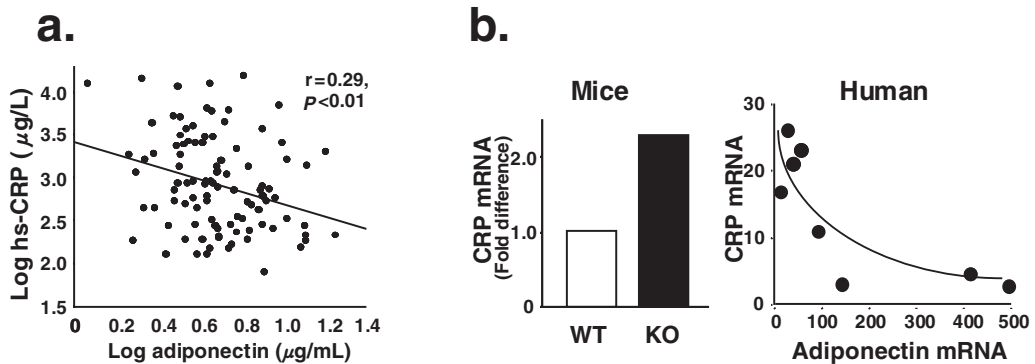


Fig. 1. Adiponectin and CRP. a. Relationship between plasma high sensitive CRP (hsCRP) and plasma adiponectin levels. b. CRP mRNA levels in the adipose tissue of wild type (WT) and adiponectin knockout mice (KO) (left). Relationship between CRP and adiponectin mRNA levels in human adipose tissue (right).

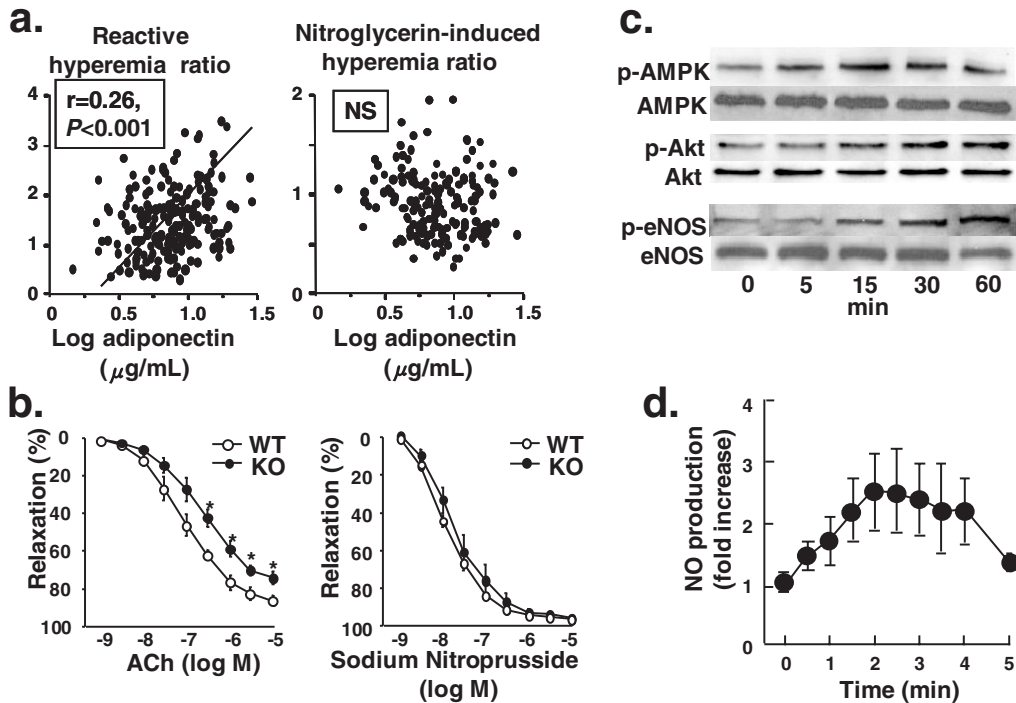


Fig. 2. Adiponectin and endothelium-dependent vasodilation. a. Correlation between plasma adiponectin concentration and reactive hyperemia ratio or nitroglycerin-induced hyperemia ratio. b. Acetylcholine-induced vasodilation in the aortic ring of wild type (WT) and adiponectin knockout mice (KO). $*P<0.05$. c. Effect of adiponectin on the phosphorylation of AMP kinase (AMPK), Akt and endogenous nitric oxide synthetase (eNOS) in vascular endothelial cells. d. Effect of adiponectin on NO production in vascular endothelial cells.

を用いて血管拡張反応を検討した。アディポネクチン欠損マウスの大動脈を用いアセチルコリン依存性血管拡張能を検討したところ、野生型に比べ障害されていることが明らかになった (Fig. 2b)。一方、内皮に依存しないニトロプルシッド血管拡張能は正常であった。これらの結果から、アディポネクチンは内皮依存性血管拡張能に関与することが示唆された。内皮依存性血管拡張能には血管内皮細胞が合成、分泌する一酸化窒素 (NO) が関与することが知られている。培養血管内皮細胞にアディポネクチンを添加すると、Akt, AMP kinaseの活性化に続き内因性NO合成酵素 (eNOS) のリン酸化がおこった (Fig. 2c)。実際アデ

ィポネクチン添加により、内皮細胞からのNO放出が促進されることが高感度蛍光法を用い確認された (Fig. 2d)。

アディポネクチンと肝線維症、がん

動脈硬化は一種の過剰な創傷治癒反応である。アディポネクチンが他臓器の創傷治癒にどのようにかわるかを、四塩化炭素を用いた肝臓障害実験を行い検討した。アディポネクチン欠損マウスに300 μ L/kg体重の四塩化炭素を週2回、12週投与すると、野生型にくらべ著明な肝線維化がおこった (Fig. 3a上段)。正常マウスにアデノウイルスを用いてアディポネクチンを高発現させると、対照のLacZを発現させたマウスに較

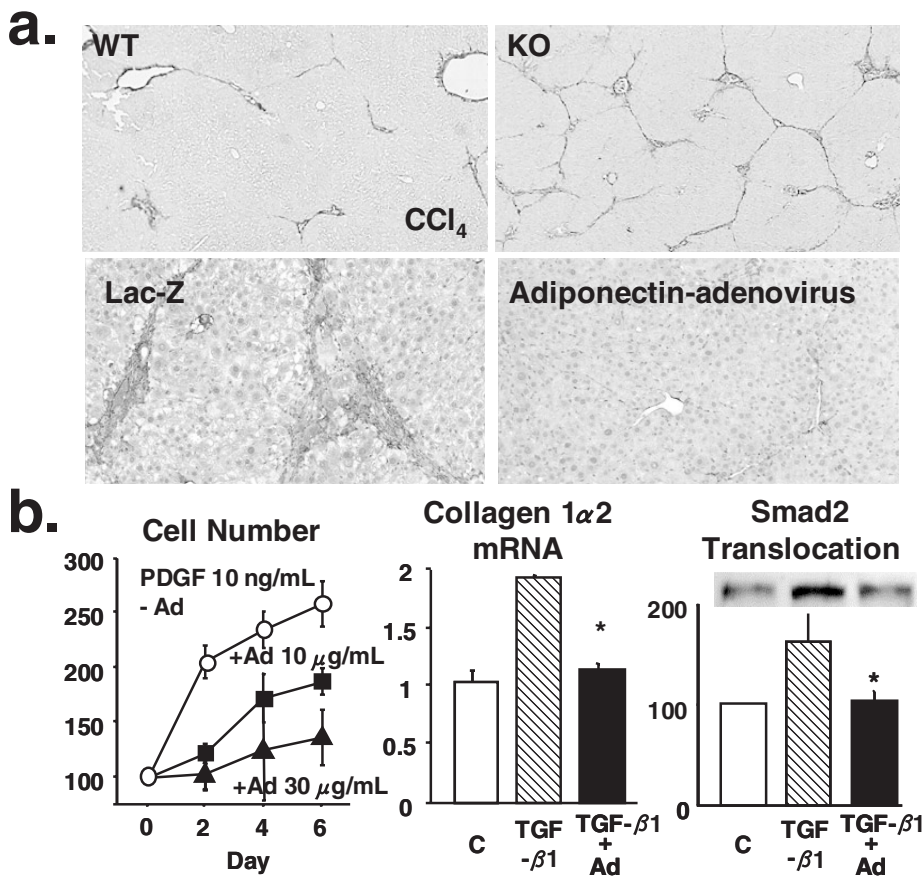


Fig. 3. Adiponectin and hepatic fibrosis. (a). Histology of the liver after carbon tetrachloride in WT (upper left) and KO (upper right) mice. α -Smooth muscle actin staining in the liver of Lac-Z (lower left) and adiponectin expressing mice (lower right). (b). Left; Suppression of the proliferation of stellate cells by adiponectin. (open circle; without adiponectin, closed square; with 10 μ g/mL adiponectin, closed triangle; with 30 μ g/mL adiponectin). Middle; Suppression of TGF- β 1-induced expression of collagen 1 α 2 mRNA levels by adiponectin in stellate cells (open bar; control, shaded bar; treated with TGF- β 1, closed bar; treated with TGF- β 1 and adiponectin). Right; Suppression of TGF- β 1-induced nuclear translocation of smad2 protein by adiponectin in stellate cells (open bar; control, shaded bar; treated with TGF- β 1, closed bar; treated with TGF- β 1 and adiponectin).

べ、線維合成にあずかる肝星細胞 (α -smooth muscle actin陽性細胞) 数が減少し、線維化は抑制された (Fig. 3a下段). 培養星細胞の増殖は増殖因子PDGFにより誘導されるが、アディポネクチンを添加しておくと増殖は抑制された (Fig. 3b左). collagen 1 α 2などの線維化関連遺伝子の発現はTGF- β 1により誘導されるが、アディポネクチンはこれを抑制した (Fig. 3b中央). TGF- β 1シグナルを伝達するSmad2の核内移行をアディポネクチンは阻害した (Fig. 3b右).

肥満と関連するがんとして乳がんが知られている。乳がんリスクと血中アディポネクチン濃度の関連について検討した。102名の乳がん患者と100名の健常女性を対象にcase-control studyを行った。家族歴、閉経年齢、妊娠歴、体格指数 (BMI) などの乳がんリスクを補正しても、低アディポネクチン血症 (Low tertile, $\leq 6.9 \mu\text{g/mL}$) 群は、高アディポネクチン血症 (high tertile, $>10.6 \mu\text{g/mL}$) 群にくらべ、有意に乳がんリスクが高かった (オッズ比3.63, 95%信頼区間1.61~8.19) (Table 1)。そこでアディポネクチンががんの増殖と関連するかを、マウス担がんモデルを用い検討した。移植したT241線維肉腫にアディポネクチンを50 $\mu\text{g/日}$ 、局所注入すると、2週間後には対照群に比べ、60%の腫瘍発育抑制を認めた (Fig. 4)。アディポネクチン投与群では腫瘍細胞のアポトーシスが亢進していた。培養腫瘍細胞に対してはアディポネクチンの増殖抑制効果はみられなかったため、生体における腫瘍増殖プロセスと関係していると考えられた。

大豆たん白質ダイエット食がアディポネクチンに与える影響

前年度までの研究で、アディポネクチンは抗動脈硬化、抗糖尿病作用を有しながら過栄養状態で分泌不全

がおこり、メタボリックシンドロームにおいて重要な役割を果たすことを示してきたが、本年度はさらに、炎症、線維化、がんに対する作用を示し、低アディポネクチン血症が肥満に関連する多くの病態と関連することが明らかになった。また前年度の研究で大豆たん白質を含むカロリー制限食により、血中アディポネクチン濃度が上昇するが、動物たん白質であるcaseinに較べ平均アディポネクチン濃度は高値であるものの有意差は得られなかった。この一因としてカロリー制限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。

そこで本年度は、非肥満動物に正常の発育環境下で大豆たん白質、またはcaseinを含む食餌を与え、それぞれが肝臓、脂肪組織の代謝関連遺伝子やそれらをコントロールする転写因子発現、さらにアディポネクチンを含むアディポサイトカイン発現に与える影響を包括的に検討した。6週雄性Wistarラットに23.4% soy protein isolate (SPI群) または22.4% casein (Casein群) を含む食餌を与え10日間飼育した。試験終了時、両者に体重の差は認めなかった (Table 2)。肝臓の代謝関連遺伝子の発現量を比較検討した。脂肪酸合成の重要なステップを司る脂肪酸合成酵素およびアシルCoA脱炭酸酵素の遺伝子発現量がSPI群で低下していた (Fig. 5)。 β 酸化を司るアシルCoA酸化酵素の発現量には差を認めなかった。肝臓組織重量あたりの中性脂肪含量はSPI群で減少していた (Table 2)。コレステロール代謝に関わるHMG-CoA還元酵素、LDL受容体の発現量は両者で差はなく、肝臓組織重量あたりのコレステロール含量にも差は認めなかった。脂肪酸代謝に関わる多くの遺伝子群はSREBP-1という転写因子により調節されている。SPI群の肝臓における

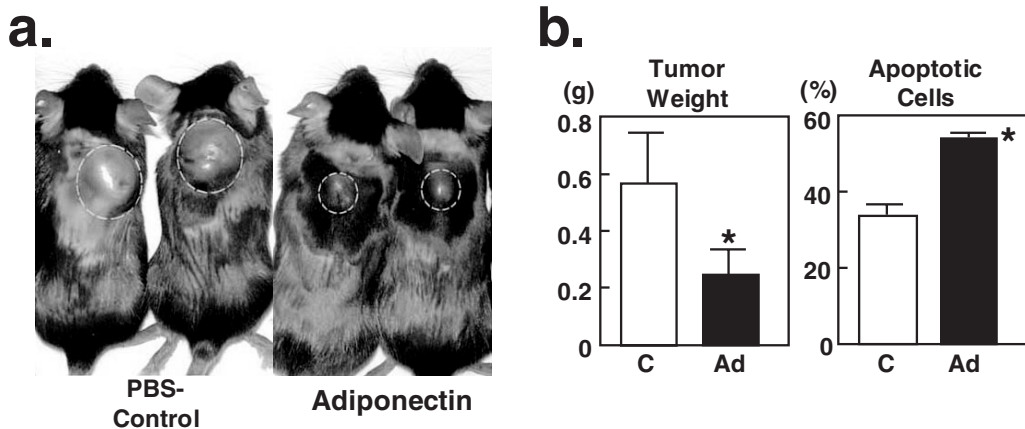


Fig. 4. a. Inhibition of tumor growth by adiponectin. b. Effect of adiponectin on tumor weight (left) and the number of apoptotic cells (right). c; control (PBS-injected mice), Ad; adiponectin-injected mice. * $P < 0.01$.

SREBP-1発現量はCasein群に較べ低かった。SREBP-2発現量には差はなかった (Fig. 5)。

次に同様に脂肪組織の代謝関連遺伝子の発現量を比較検討した。脂肪組織においても脂肪酸合成酵素の遺伝子発現量はSPI群の方がCasein群より低かった (Fig. 6)。他の脂肪酸合成系のアシルCoA脱炭酸酵素、マリック酵素、アシルCoA合成酵素や、リポたん白質に由来する脂肪酸供給に関与するリポたん白質リパーゼ、グリセロール合成の基質となるグルコース取り込

みに関与するグルコーストランスポーター4遺伝子の発現量は両群で差を認めなかった。肝臓と異なりSREBP-1発現量は両群で差はなかった。脂肪組織重量あたりの中性脂肪含量はSPI群で低かった (Table 2)。脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるPPAR γ 2の発現量も両群で差を認めなかった。

脂肪組織における各種アディポサイトカイン発現量を検討した (Fig. 7)。アディポネクチン遺伝子発現量はCasein群に較べSPI群で有意に高く、血中濃度もSPI群で高値であった。PAI-1およびレプチン遺伝子発現量はSPI群で低かった。アンジオテンシノーゲン、TNF α 遺伝子発現量は両群で差はなかった。

健康成人20名を対象に大豆たん白質食が血中アディポネクチン量に与える影響を検討した。細粒状精製大豆たん白質製品を1日25 g (大豆たん白質量として約20 g)、日常の食事に添加して摂取した。体重には変化はなかったが、ウエスト周囲径は大豆たん白質食の摂取後減少した ($P<0.05$)。血中アディポネクチン濃度およびその変化率は、今回の検討ではこの食事条件では有意な変化はみられなかった (Fig. 8)。血中アディポネクチン濃度低下例はメタボリックシンドローム

Table 1. Relationship between serum adiponectin and breast cancer risk

Plasma Adiponectin	Cases (%)	Controls (%)	Odds Ratio (95% CI)
High Tertile >10.6	17	33	1.00
Middle Tertile $\leq 10.6, >6.9$	35	33	2.79* (1.23-6.35)
Low Tertile ≤ 6.9	48	34	3.63** (1.61-8.19)

Data are adjusted for age, family history, age at menarche, parity, BMI, and age at menopause for postmenopausal. * $P<0.05$, ** $P<0.005$.

Liver

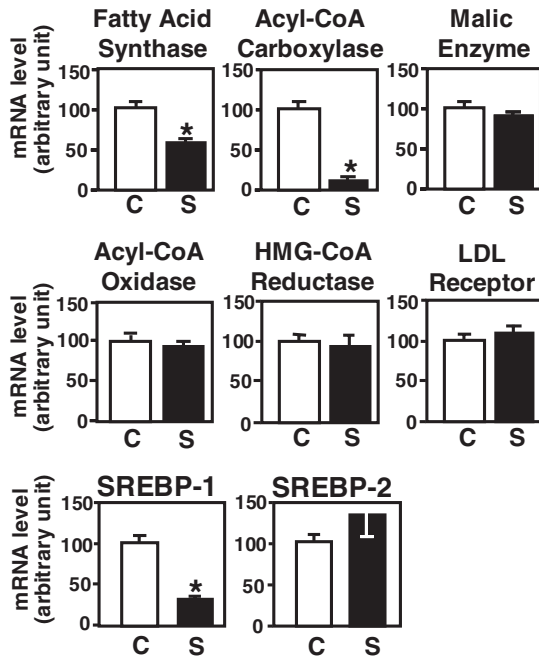


Fig. 5. The mRNA levels of genes related fatty acid and cholesterol metabolism in the liver of Wistar rats fed casein diet (C) or soy protein isolate diet (S). * $P<0.05$.

Adipose Tissue

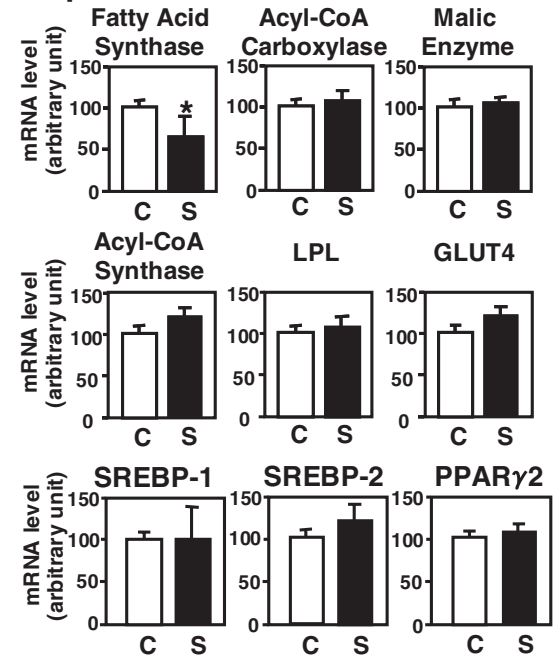


Fig. 6. The mRNA levels of lipid and glucose metabolism related genes in the adipose tissue of Wistar rats fed casein diet (C) or soy protein isolate diet (S). * $P<0.05$.

Table 2. Effects of soy protein diet on body weight, metabolic parameters and lipid contents in adipose tissue and liver composition in Wistar rats

	n	Casein diet	SPI diet
		8	8
Body and organ weight, food intake			
Initial weight (g)		173.9 ± 1.8	173.9 ± 1.8
Final weight (g)		223.9 ± 2.3	220.6 ± 3.8
Weight gain (g/day)		5.00 ± 0.24	4.67 ± 0.24
Food intake (g/day)		17.7 ± 0.4	17.7 ± 0.5
Plasma analysis			
Triglyceride (mg/100mL)		141.1 ± 7.4	82.6 ± 4.7*
Cholesterol (mg/100mL)		97.1 ± 3.3	70.9 ± 1.6*
FFA (μ Eq/L)		824.6 ± 48.8	629.6 ± 46.3*
Glucose (mg/100mL)		182.0 ± 3.5	182.0 ± 2.3
Insulin (μ U/mL)		124.5 ± 7.2	127.7 ± 8.6
Triglycerides			
Adipose tissue (mg/g tissue)		756.1 ± 23.4	655.4 ± 32.0*
Liver (mg/g tissue)		34.8 ± 2.6	24.2 ± 1.7*
Cholesterol			
Liver (mg/g tissue)		2.81 ± 0.12	2.76 ± 0.09

* $P < 0.05$ vs Casein group by Student's *t* test.

の合併率、冠動脈疾患の危険度が高いが、今回の対象で血中アディポネクチン濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ の群は、大豆たん白質食により血中濃度が増加する傾向がみられた (Fig. 8, $P < 0.10$).

考 察

メタボリックシンドロームは動脈硬化疾患の一般的な基礎病態である。その上流には食習慣、運動習慣の変化による腹腔内臓脂肪蓄積が深く関与している。本研究は、脂肪組織を巨大な内分泌臓器と捉え、ここから分泌されるアディポサイトカイン分泌異常がメタボリックシンドローム発症に繋がると考えて、大豆たん白質が脂肪細胞機能、特にアディポサイトカイン発現、分泌にどのような影響を与えるかを明らかにしようとしたものである。前年度までの研究で、アディポサイトカインの中でも私達が発見したアディポネクチンが抗動脈硬化、抗糖尿病作用を有することを実験的、臨床的に明らかにし、大豆たん白質を含むダイエット食がアディポネクチン分泌不全を改善することを報告してきた。最終年度は、アディポネクチン分泌不全がメタボリックシンドロームにとどまらず、炎症、線維

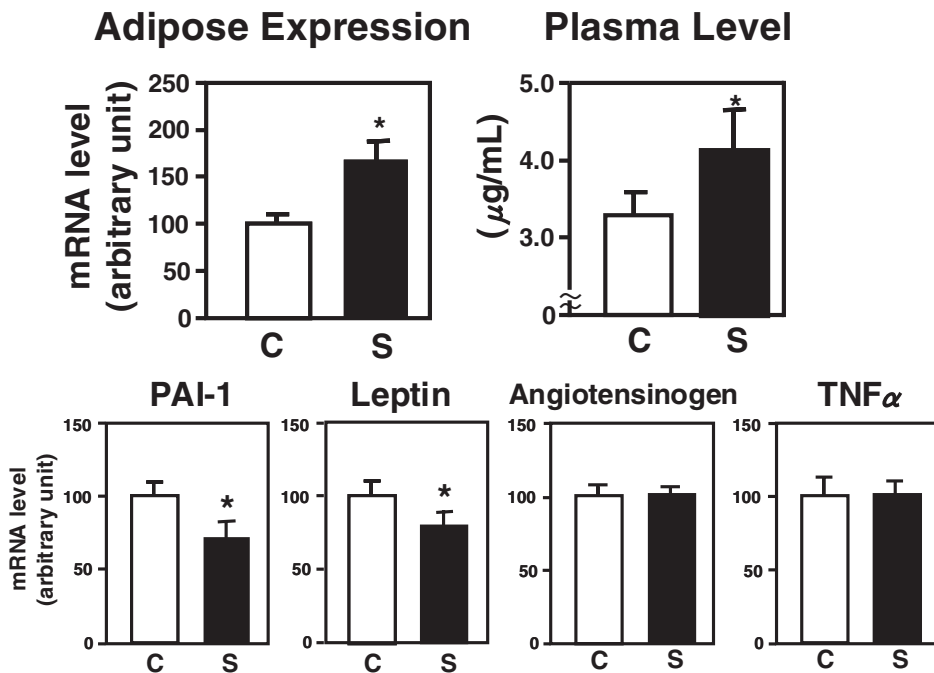


Fig. 7. The mRNA level and plasma concentration of adiponectin and mRNA levels of adipocytokines in Wistar rats fed casein diet (C) or soy protein isolate diet (S). * $P < 0.05$.

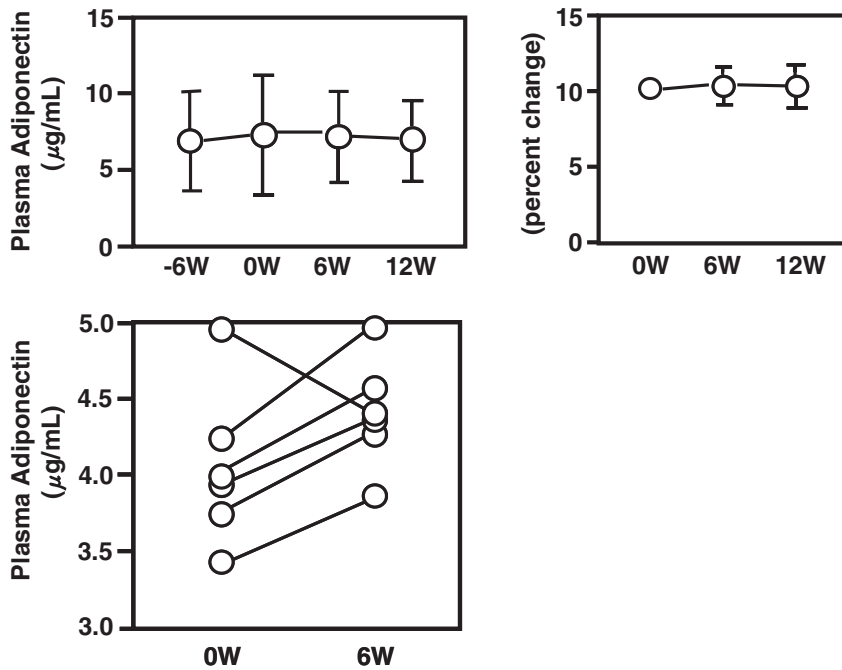


Fig. 8. Changes in plasma adiponectin concentration after ingestion of soy protein formula. Left; Plasma adiponectin level (Mean \pm SD), Right; Percent changes of plasma adiponectin level, Lower; Changes of adiponectin concentration in the subjects with baseline adiponectin level less than 5 μ g/mL.

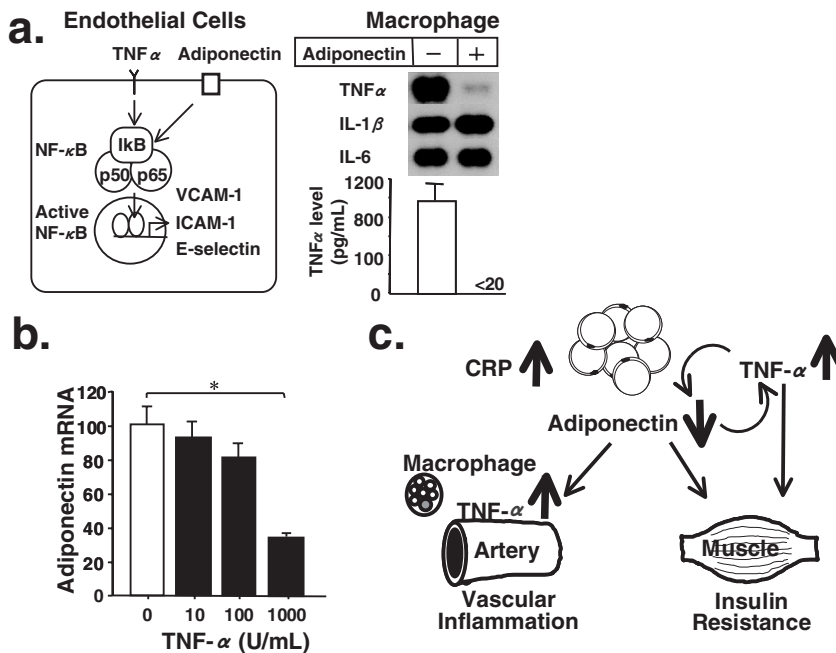


Fig. 9. Adiponectin and TNF α . a. Suppression of TNF α signaling by adiponectin in vascular endothelial cells (left). Suppression of TNF α expression by adiponectin in macrophage (right). b. Suppression of adiponectin mRNA level by TNF α . * P <0.01. c. Schematic diagram of the role of adiponectin in inflammation, insulin resistance and atherosclerosis.

化, がんなど, 肥満に関連する多くの病態に関与することを明らかにし, さらに大豆たん白質食が脂肪組織発現遺伝子に及ぼす影響を包括的に解析した.

血管内皮細胞が傷害をうけるとICAM-1, VCAM-1, E-Selectinなどの接着分子を発現して流血中の単球を接着する. 単球は内皮下に進入してTNF α などのサイトカインを分泌し, 中膜血管平滑筋の内膜への遊走, 増殖を促すとともに, コレステロールエステルを貯め込んで泡沫細胞となる. これが動脈硬化の初期反応である. 最近, 動脈硬化進展過程に炎症反応が関与することが注目されている. Fig. 9にアディポネクチンを中心とした脂肪細胞機能と, 炎症, 動脈硬化, インスリン抵抗性の関連のシェーマを示す. 私達はこれまで, アディポネクチンが炎症性サイトカインであるTNF α のシグナル伝達経路を抑制することにより, 下流にある転写因子NF κ Bにより誘導されるICAM-1, VCAM-1, E-Selectinなどの接着分子発現を抑制することを報告した (Fig. 9a). またマクロファージにおけるサイトカイン分泌のうちでTNF α 発現, 分泌を選択的に抑制する (Fig. 9b). つまりアディポネクチンはTNF α のシグナル伝達, 発現双方を抑制する抗炎症作用をもつ. 一方, TNF α は脂肪細胞におけるアディポネクチン発現, 分泌を抑制し, この2つのアディポサイトカインは脂肪細胞において互いの発現を抑制している. 過栄養負荷によりアディポネクチン分泌が低下すると, 脂肪細胞からのTNF α 分泌が亢進することが予想され, これはさらにアディポネクチン分泌を低下させる. アディポネクチン分泌不全, TNF α 分泌増加は筋肉においてインスリン抵抗性を惹起させる. 流血中のアディポネクチン濃度低下は, 血管局所のマクロファージTNF α 分泌を亢進させ, 炎症反応を惹起すると考えられる. 今回の検討でアディポネクチンは炎症マーカーであるCRPの脂肪細胞での発現を抑制することが示された¹¹. これら一連の現象が動脈硬化疾患や2型糖尿病において軽度のCRP上昇を導く一因となっている可能性が考えられた. 脂肪組織CRPの意義は未だ明らかではないが, この組織が多くの補体分子を発現していることから, 過栄養に対するバッファー機能のみでなく, 炎症に対する防御機能を有している可能性も充分考えられる.

高血圧はメタボリックシンドロームの重要な病態である. 一般集団で血中アディポネクチン濃度との相関関係で見ると, HDLコレステロール, トリグリセライド濃度やインスリン抵抗性指標にくらべ, 血圧との関連は低い. しかし本態性高血圧症例でみると血中アディポネクチン濃度は血圧と逆相関する. アディポネク

チン欠損マウスは高脂肪高食塩負荷を行うと, わずかに対照マウスより血圧が上昇した. 今回の検討でアディポネクチンは血管内皮細胞のNO合成を高め, 内皮依存性血管拡張反応を高めることが明らかになった²⁻⁴. 低アディポネクチン血症は, 内皮依存性血管拡張反応を介し, 高血圧の発症に一役を担っている可能性がある. 昨年報告した動脈硬化への直接的な作用のみでなく, アディポネクチン分泌不全は, インスリン抵抗性, 高血圧などメタボリックシンドロームの各コンポーネントの発症にも関わっている. これらは互いに独立しており, アディポネクチンのインスリン抵抗性惹起作用を介しておこっているのではないことは注目すべきである. 以上のように内臓脂肪蓄積時の低アディポネクチン血症はメタボリックシンドロームの病態形成に重要な意義を持つと考えられる. 血中アディポネクチン濃度4 μ g/mL以下の低アディポネクチン血症は冠動脈疾患のリスクが2倍となる⁵. アディポネクチンは血中で多量体を形成しており, その存在様式が機能発現にも重要であることも明らかになってきている. 即ち3量体がさらに重合してできる高分子多量体が機能発現に重要であり, 冠動脈疾患患者では高分子多量体が減少している⁶. また一般に過栄養という環境負荷が低アディポネクチン血症の主な要因であるが, 遺伝子変異による遺伝的な低アディポネクチン血症もまたメタボリックシンドロームの形質をとり冠動脈疾患と関連することを明らかにしている^{7,8}.

線維化は創傷治癒反応であるが, 過剰におこると臓器機能を障害する重篤な反応でもある. 今回の検討により, アディポネクチン欠乏は肝線維化を促進することが示された⁹. 近年, 肥満に伴う脂肪肝から非アルコール性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis) を経て, 肝線維症, さらに肝がんに移行する経路が注目されている. 特にウイルス性肝炎の頻度が低い欧米での関心が高い. アディポネクチン分泌不全は, 動脈硬化疾患, 糖尿病など循環器疾患や内分泌代謝疾患のみでなく消化器疾患を含めた広く, 過栄養に起因する病態の発症に関与する可能性がある. 肥満に合併しやすいがんとして, 乳がん, 子宮体がん, 大腸がんなどが知られている. 今回の検討で, 低アディポネクチン血症は乳がんのリスクとなることが示された¹⁰. 重要な点は肥満度を考慮しても低アディポネクチン血症がリスクとなることである. 低アディポネクチン血症そのものががんの発症, 増殖, 進展になんらかの作用を及ぼすか否かは今後検討すべき課題である. 今回の検討では, 培養がん細胞に対する作用は見られなかったが, マウスに移植したがん細胞の増殖を抑制した¹¹. がんが発生

する細胞環境に対するアディポネクチンの影響や、部位特異性についても今後の検討が必要である。

最終報告では、これら分泌機能を中心に大豆たん白質が脂肪細胞機能に与える影響を包括的に解析した結果を示した¹²⁾。植物性たん白質である大豆たん白質食を動物性のカゼイン食と比較すると、摂餌量、体重には差を認めなかったが、血中中性脂肪濃度、遊離脂肪酸濃度が大豆たん白質食を摂食した群で低下していた。肝臓の脂肪酸合成律速酵素である脂肪酸合成酵素の遺伝子発現が抑制されており、その一因として、脂肪酸合成酵素の転写を司るSREBP-1の発現抑制が考えられた。SREBPは膜アンカー型の転写因子で、本来細胞内コレステロール量が低下すると小胞体膜を離れて核内移行し、HMG-CoA還元酵素やLDL受容体遺伝子発現を増加させて細胞内コレステロール量を保つ調節を行っている。しかしこの本来の機能を主に担うのはアイソフォームであるSREBP-2であり、SREBP-1はむしろ脂肪酸合成系の遺伝子発現をコントロールしていると考えられている。今回の検討では、大豆たん白質食はSREBP-2発現やコレステロール合成系遺伝子発現には影響を与えず、血中コレステロール濃度もカゼイン群と差はなかった。インスリンが肝SREBP-1発現を抑制することが知られているが、血中インスリン濃度はカゼイン食群と差はなく、大豆たん白質食によるSREBP-1発現抑制のメカニズムは不明である。一方脂肪組織においても脂肪酸合成酵素の遺伝子発現は抑制されていたが、SREBP-1発現はカゼイン食と差がなかった。脂肪組織における脂肪酸合成酵素の発現抑制は、肝臓からのVLDL分泌低下による二次的な現象かも知

れない。大豆たん白質食に脂肪細胞分化抑制効果があり、脂肪酸合成酵素の発現や、組織中性脂肪含量を抑えた可能性も考えられるが、強制的な脂肪細胞分化抑制はむしろ代謝に好ましくない影響を与えることが脂肪萎縮性糖尿病をモデルに明らかになってきている。本研究では大豆たん白質食がカゼイン食と較べ、体重に影響を与えることなく、脂肪組織のアディポサイトカイン発現を変化させることを明らかにした。すなわち、抗動脈硬化、抗糖尿病作用をもつアディポネクチン発現を増加させ、血栓形成に関与するPAI-1発現を低下させた。これらの効果は強いものではないが、動脈硬化防御に対し利点を有すると考えられる。大豆たん白質食に含まれるイソフラボンにはエストロゲン作用があり脂肪細胞分化を促進することが報告されているが、このような作用では脂肪組織中性脂肪含量の低下やアディポサイトカイン発現変化を説明することはできない。アディポネクチン発現調節の分子機構がしだいに明らかになってきており¹³⁾、今後大豆たん白質食の成分分析を含めた研究が必要であろう。健常成人を対象に、大豆たん白質量として約20 gの大豆たん白質食を指導し、血中アディポネクチン濃度の変化を検討したが、今回の検討では血中アディポネクチン濃度およびその変化率に有意な変化はみられなかった。しかし、ハイリスクの血中アディポネクチン濃度低下例では血中濃度が増加する傾向がみられ、今後、このような集団で大豆たん白質食が血中アディポネクチン濃度に影響を与えうるかを多数例で検討する必要があると思われる。

要 約

本研究の目的は生活習慣病、特にメタボリックシンドロームと呼ばれる動脈硬化リスク集積状態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。本研究により、私達が発見したアディポネクチンが種々の生体防御作用をもっているが、内臓脂肪蓄積による分泌不全がメタボリックシンドロームの病態発症に関与していること、一方大豆たん白質食は少なくとも動物実験においては脂肪組織でのアディポネクチン発現、分泌を増加させることが明らかになった。

文 献

- 1) Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H and Matsuzawa Y (2003): Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*, **107**, 671-674.
- 2) Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N,

- Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T and Matsuzawa Y (2003): Association of hypo-adiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension*, **42**, 231-234.
- 3) Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T and Walsh K (2004): Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, **279**, 1304-1309.
 - 4) Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I and Quon MJ (2003): Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 45021-45026.
 - 5) Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y, for Osaka CAD Study Group (2003): Association of hypo-adiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol*, **23**, 85-89.
 - 6) Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T and Matsuzawa Y (2004): Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res*, **94**, e27-31.
 - 7) Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Nagaretani H, Kumada M, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Hiraoka H, Iwashima Y, Ishikawa K, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H, Ogihara T and Matsuzawa Y (2004): Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, **43**, 1195-1200.
 - 8) Kishida K, Nagaretani H, Kondo H, Kobayashi H, Tanaka S, Maeda N, Nagasawa A, Hibuse T, Ohashi K, Kumada M, Nishizawa H, Okamoto Y, Ouchi N, Maeda K, Kihara S, Funahashi T and Matsuzawa Y (2003): Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 286-292.
 - 9) Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Fukui K, Maeda N, Nishizawa H, Nagaretani H, Okamoto Y, Kihara S, Miyagawa J, Shinomura Y, Funahashi T and Matsuzawa Y (2003): Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology*, **125**, 1796-1807.
 - 10) Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y and Noguchi S (2003): Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res*, **9**, 5699-5704.
 - 11) Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhitovovskiy B, Funahashi T and Cao Y (2004): Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 2476-2481.
 - 12) Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M and Shimomura I (2003): Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*, **52**, 1655-1663.
 - 13) Nagasawa A, Fukui K, Kojima M, Kishida K, Maeda N, Nagaretani H, Hibuse T, Nishizawa H, Kihara S, Waki M, Takamatsu K, Funahashi T and Matsuzawa Y (2003): Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 909-914.