

反芻家畜の脂肪細胞の発達および乳腺細胞の乳汁分泌機能に及ぼすケメリン・ケメリン受容体遺伝子の発現様相およびその作用

(The relationships between gene expression pattern of chemerin and chemerin receptor and its role on development of adipocytes and lactation function of mammary gland cells in ruminant)

松野 景

2019 年

反芻家畜の脂肪細胞の発達および乳腺細胞の乳汁分泌機能に及ぼすケメリン・ケメリン受容体遺伝子の発現様相およびその作用

(The relationships between gene expression pattern of chemerin and chemerin receptor and its role on development of adipocytes and lactation function of mammary gland cells in ruminant)

松野 景

鳥取大学大学院連合農学研究科

2019年

## 目 次

第 1 章	緒論	
1. 1	本研究の目的	1
1. 2	本研究の意義	3
1. 2. 1	脂肪細胞と乳腺上皮細胞の分化・増殖および固有機能に影響を及ぼす要因の解明	3
1. 2. 2	炎症性物質と炎症性物質ケメリンの生理作用およびケメリンが脂肪細胞・筋細胞・乳腺上皮細胞に及ぼす影響	4
1. 2. 3	ケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現を制御する要素	8
第 2 章	ヒツジ脂肪細胞におけるケメリンおよびケメリン受容体遺伝子発現の検討	
2. 1	緒言	11
2. 2	材料および方法	12
2. 3	結果および考察	14
2. 4	小括	23
第 3 章	異なる脂肪酸処理がヒツジ前駆脂肪細胞の脂質蓄積および分化に及ぼす影響	
3. 1	緒言	24
3. 2	材料および方法	25
3. 2. 1	培養ヒツジ前駆脂肪細胞の作成	25
3. 2. 2	培養前駆脂肪細胞への脂肪酸処理	25
3. 2. 3	脂質蓄積および遺伝子発現の調査	26
3. 2. 4	統計分析	28

3.3	結果および考察	28
3.4	小括	36
第4章	クレアチニンがヒツジ成熟脂肪細胞のケ メリン・ケメリン受容体遺伝子発現に及ぼ す影響	
4.1	緒言	37
4.2	材料および方法	39
4.2.1	ヒツジ培養前駆脂肪細胞の培養	39
4.2.2	オイルレッド染色	40
4.2.3	クレアチニン処理	40
4.2.4	遺伝子分析	41
4.2.5	統計解析	42
4.3	結果および考察	42
4.3.1	ヒツジ培養前駆脂肪細胞の培養と分化	42
4.3.2	ヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解に対 するクレアチニンの作用	44
4.3.3	ヒツジ成熟培養脂肪細胞の mRNA 発現に 対するクレアチニンの作用	47
4.3.4	考察	54
4.4	小括	56
第5章	ウシ乳腺上皮細胞の乳分泌機構に及ぼす ケメリン受容体の遺伝子発現に対するク レアチニンの作用	
5.1	緒言	57
5.2	材料および方法	58
5.2.1	細胞培養	58

5.2.2	培地分析	59
5.2.3	遺伝子分析	59
5.2.4	統計解析	61
5.3	結果および考察	61
5.3.1	遺伝子分析	61
5.3.2	培地分析	65
5.3.3	考察	69
5.4	小括	71
第6章	総合結論	
6.1	各実験の結論	74
6.2	本論文の結論	80
謝辞		83
摘要		84
参考文献		91
報文目録		102

## 略語

aP2	adipocyte protein, 脂質合成関連遺伝子
BMI	Body Mass Index, 肥満指数
chemerinR	chemerin receptor, ケメリン受容体
CMKLR1	Chemokine Like Receptor 1, ケモカイン様受容体 1
C/EBP $\alpha$	CCAAT-enhancer-binding protein $\alpha$ , 脂肪細胞分化 関連遺伝子
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ダルベッコ 改変イーグル培地
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2, 細胞 外シグナル調節キナーゼ
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, グリ セルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine, 3-イソブチル-1-メ チルキサンチン
IL-6	Inter Leukin 6, インターロイキン 6
LCFA	Long Chain Fatty Acid, 長鎖脂肪酸
MAC-T cell	Mammary Alveolar Cells-large T antigen, large T 抗原による不死化ウシ乳腺細胞群
MCFA	Medium Chain Fatty Acid, 中鎖脂肪酸
mTOR	mammalia target of rapamycin, 哺乳類のラパマイ シン標的タンパク質
NEFA	Non Esterified Fatty Acid, 非エステル型脂肪酸
PPAR- $\gamma$ 2	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$ 2, ペルオキシソーム増殖因子応答性受容体 $\gamma$ 2

SCFA	Short Chain Fatty Acid, 短鎖脂肪酸
TG	Triglyceride, 中性脂肪
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ , 腫瘍壊死因子 $\alpha$
TZD	Thiazolidinedione, チアゾリジンジオン

## 単位

mg	ミリグラム
ng	ナノグラム
$\mu$ g	マイクログラム
mL	ミリリットル
dL	デシリットル
L	リットル
mM	ミリモル
nm	ナノメートル



# 第1章 緒論

## 1.1 本研究の目的

畜産分野では食肉の肉質改善ならびに乳生産量増加が生産成績向上のために不可欠である。本研究では、炎症性物質であるケメリンに注目し、筋細胞および脂肪細胞の増殖の制御および乳生産量の制御に関与する家畜生理関連の要因についての新たな知見を得ることを目的とした実験を行った。ケメリンは脂肪細胞からのアディポカインの分泌を制御するという報告(Goralski ら 2007)のほか、脂肪細胞に対して作用し、脂肪細胞の脂質蓄積に影響を及ぼすという結果が報告されている (Roh ら 2006, Sell ら 2009, Fu ら 2016)。これらの実験結果は実験材料として主にヒト、マウスの脂肪組織および培養脂肪細胞を用いた実験によって得られたものである。ヒト、マウスなどの単胃動物はグルコースを主な代謝基質としているが、反芻家畜はルーメン内微生物発酵によって産生される短鎖脂肪酸を主な代謝基質としているため、これらの報告を反芻家畜栄養の基礎的知見にすることはできない。一方、ケメリンの作用についてヒツジ、ウシの脂肪組織および培養脂肪細胞を材料として実験した報告は限られている (Song ら 2010, Suzuki ら 2012, Fu ら 2016)。ヒト、マウスを実験材料としたケメリンの作用に関する過去の研究成果を畜産分野に応用するためには、反芻家畜の脂肪組織および培養脂肪細胞を実験材料としたケメリンの作用に関する研究が不可欠となる。

実験 1 では、ヒツジ培養脂肪細胞を実験材料として、細胞分化過程での

ケメリン・ケメリン受容体の遺伝子発現、ケメリンの添加により脂質蓄積および脂肪細胞増殖に及ぼす影響の調査による、ヒツジ培養脂肪細胞でのケメリン・ケメリン受容体の遺伝子の発現を検出し、ヒツジ培養脂肪細胞でのケメリンの脂質蓄積および細胞増殖に対する作用について検討した。

脂肪酸は反芻家畜のルーメン内微生物により飼料中の栄養素が分解され、揮発性脂肪酸として血液中に移行する。これら血液中の揮発性脂肪酸および異なる炭素鎖数の脂肪酸である短鎖脂肪酸・中鎖脂肪酸・長鎖脂肪酸のうち、長鎖脂肪酸が脂肪組織の発達に影響を与えるという報告があるため(Poridoli ら 2012)、実験 2 ではヒツジ培養前駆脂肪細胞を実験材料として、異なる炭素鎖数からなる脂肪酸がヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化様相および脂肪細胞内の脂質増減へ及ぼす影響を検討した。異なる炭素鎖数の脂肪酸である短鎖脂肪酸・中鎖脂肪酸・長鎖脂肪酸のそれぞれのケメリンおよび他の炎症性物質の遺伝子の発現誘導能の有無について検討した。

ウシの生体内では泌乳期においてクレアチニン濃度が増加することが認められている(Piccione ら 2012) が、クレアチニンが泌乳に関連する乳腺上皮細胞の乳汁分泌能・脂肪細胞における脂質代謝に及ぼす影響については明確にされていない。そのため、実験 3 ではクレアチニンが細胞内の脂質分解に関与するケメリン・ケメリン受容体および炎症性物質 TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を介してクレアチニンが脂肪細胞の脂質蓄積量に及ぼす影響について *in vitro* 細胞培養の手法を用いて検討した。

ウシ生体内ではクレアチニンと同様に泌乳期で泌乳関連ホルモンプロラクチンが増加することが認められている(Bevers ら 1978)。実験 4 では、ウシ培養乳腺上皮細胞から分泌される乳成分ならびに  $\kappa$ -カゼイン、ケ

メラニン受容体の遺伝子発現へのクレアチニン濃度の影響を調査し、クレアチニンが乳腺上皮細胞の乳汁分泌機構に及ぼす影響を検討した。同時に、プロラクチンの無添加・添加で条件を分け、ウシ生体における泌乳期と泌乳していない期間で乳腺上皮細胞に対するクレアチニンの影響について検討した。

本研究の目的に沿った実験1, 2, 3および4で得られた実験成果により、ケメリン・ケメリン受容体の遺伝子発現が脂肪細胞および乳腺上皮細胞の増殖の調節および脂質蓄積能への関与が検討でき、前駆脂肪細胞および乳腺上皮細胞の増殖と分化の制御のほか、乳生産量の制御などに関与するという情報が得られると思われる。

## 1.2 本研究の意義

### 1.2.1 脂肪細胞と乳腺上皮細胞の分化・増殖および固有機能に影響を及ぼす要因の解明

脂肪細胞は生体内に普遍的に存在している細胞であるが、細胞の機能の相違のほか、細胞内の構成物の違いから白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞に分けられている。褐色脂肪細胞はヒトでは通常、出産された直後の体温の調節に関与するとされ、成長と共に消失する。食肉に含まれている脂肪細胞は白色脂肪細胞である。また、白色脂肪細胞の主な機能は細胞内に脂肪を蓄積することだと考えられてきたが、近年ではこの白色脂肪細胞から多様な生理的機能を有する物質であるアディポカインが分泌され、アディポカインは生体内の種々の組織に対して影響を及ぼすことが明らかにされている (Song ら 2010, Latronico ら 2016)。一例として、白色脂肪細胞か

らは炎症性物質であるケメリンと TNF- $\alpha$  が分泌され、白色脂肪細胞内の細胞内脂肪滴の分解が促進されるという報告があり (Makki ら 2013)、炎症性物質は脂肪細胞の過度の肥大化を調節することが示唆されている。

一方、乳腺上皮細胞は生体内で乳腺にのみ分布が限定している上皮細胞の一種で、乳汁分泌という重要な生理機能を担っている。乳腺上皮細胞から分泌された乳汁は乳腺内で集められて体外に分泌される。乳腺上皮細胞は泌乳期には様々な種類のホルモンの作用によって発達し、血中の栄養素を取り込み、乳汁の主要成分である乳タンパク、乳脂肪および乳糖を合成し、分泌する。このような作用は血中のグルコース・中性脂肪などの栄養素の量により分泌される乳汁量が制御されるとともに、プロラクチンなどの様々なホルモンおよび炎症性物質により影響を受けることが示唆されている (Suzuki ら 2015)。

食肉生産の分野では食肉を構成する細胞の中でも脂肪細胞の増殖・分化が食肉の脂肪交雑について密接に関係している。また、乳生産についても、乳腺を構成し、乳汁分泌に直接的に関与する乳腺上皮細胞の増殖・分化が乳生産に深く関与している。脂肪細胞および乳腺上皮細胞の増殖・分化に関与する因子について分子生物学的手法を用いて把握することは、食肉生理分野、ひいては畜肉生産分野に影響を及ぼす要因について、個体レベルを超えてより詳細に細胞レベルでの解明を可能とする課題である。

### **1.2.2 炎症性物質と炎症性物質ケメリンの生理作用およびケメリンが脂肪細胞・筋細胞・乳腺上皮細胞に及ぼす影響**

炎症性物質とは生体内で血管の拡張・免疫細胞の遊走の誘導など炎症反応に関与する物質である。炎症性物質はこれらの作用の他に、生体組織を

構成する細胞の増殖・分化・細胞死など多種多様な細胞機能へ影響を及ぼすほかに、他の炎症性物質の分泌の誘導などが報告されている（鈴木ら 2015）。炎症反応に関与する作用が数多く報告されている炎症性物質としては TNF- $\alpha$  などがよく知られているが、近年に発見された新奇炎症性物質であるケメリンも免疫細胞の遊走の誘導などの報告がされており（Roh ら 2016）、TNF- $\alpha$  と同様の作用を持つと考えられる。

代表的な炎症性物質としての TNF- $\alpha$  の分泌に関する報告として、ヒトでは運動量・BMI および血中成分によって筋組織および脂肪組織での TNF- $\alpha$ ・IL-6 の分泌量が増えるという報告がなされている（Kern ら 2001, Steensberg ら 2002）。その他にも細胞の増殖、代謝の調節などの機能への作用に関する報告として、TNF- $\alpha$  が成長ホルモンおよびインスリンと共にマウス脂肪細胞に対する IL-6 遺伝子発現の増加とインスリン抵抗性を誘導する事例（Fasshauer ら 2003）のほか、TNF- $\alpha$  のラット骨格筋細胞に対する細胞増殖を促進する報告がある（Li ら 2003）。TNF- $\alpha$  がマウス心筋細胞に対するタンパク質合成と細胞発達を促進し、他のサイトカインとともに細胞死の増加を誘導する報告が存在する（Hiraoka ら 2001, Xu ら 2011）。さらに、炎症性物質による細胞のホルモン感受性の変化に関する報告として、TNF- $\alpha$  は IL-6 とともにヒト脂肪細胞に対するインスリン抵抗性を誘導するという報告（Rotter ら 2003）のほか、TNF- $\alpha$  がレプチン・IL-15 とともに脂肪組織と骨格筋において脂質代謝、脂質蓄積、グルコース取り込みを調節することも報告されている（Argiles ら 2005）。以上のように、炎症性物質は血管の拡張、免疫細胞の遊走の誘導など、生体の機能に影響を及ぼすと同時に、細胞の増殖・分化、細胞のホルモンに対する感受性などの多種多様な機能に影響を与えることが明らか

かにされている。

これらの炎症性物質のうち、新奇の炎症性物質であるケメリンに着目した。ケメリンは当初、乾癬病の皮膚から発見された新奇の炎症性物質であり、**CMKLR1** のリガンドとしての働きのほか、白血球の走化性の誘導に関連する知見が得られていた (**Roh** ら **2016**)。その後、ケメリンの脂肪組織と肝臓組織からの分泌が発見され、ケメリン受容体が筋細胞、乳腺上皮細胞および脂肪細胞自身にも存在するという報告がなされている (**Fan** ら **1998**, **Song** ら **2010**, **Rourke** ら **2014**)。ケメリンの受容体の種類として **CMKLR1**、**CCRL2**、**Gpr1** が報告されている (**Roh** ら **2016**)。ケメリンは生体内の様々な臓器が発現部位であるが、特に肝臓・脂肪組織での発現が顕著であると言われている (**Song** ら **2010**)。脂肪細胞から分泌されることからアディポカインの一種と位置づけられており、脂質分解および他の炎症性物質の誘導、細胞のインスリン感受性への影響など、細胞の機能に関連する物質分泌ならびに生理作用に関しての影響が報告されている (**Suzuki** ら **2012**, **Fu** ら **2016**)。肝臓組織からは多種のヘパトカインと総称される内分泌因子が分泌されているが、**鈴木ら (2015)** はケメリンがヘパトカインの一種でもあり、反芻家畜の代謝調節機構に影響を与える分泌タンパク質であると報告している。また、ケメリンは脂肪細胞の機能に関連する物質分泌ならびに脂肪細胞の生理活性に関する影響の他にも脂質分解の促進、他の炎症性物質を分泌する細胞群の炎症部位への誘導および細胞のインスリン感受性への影響など、生体内で多くの作用を受け持っていると報告されている (**鈴木ら 2015**)。

炎症性物質としてのケメリンの分泌についての研究およびケメリンの培養細胞に対する生理作用の研究は数多くなされている。ケメリンの分泌

および細胞のホルモンに対する感受性を制御する報告として、ヒト脂肪組織でのケメリンの分泌が確認され、TNF- $\alpha$ および PPAR $\gamma$ によってケメリン遺伝子の発現が制御されることならびにケメリンがヒト脂肪細胞と骨格筋細胞でインスリン抵抗性を誘導する報告が存在する他(Sell ら 2009)、ケメリンがラット心筋細胞に対してインスリン抵抗性を誘導する報告がある (Zhang ら 2014) 。また、脂肪組織の肥大化により分泌されるアディポカインの種類が切り替わり、肥大化した脂肪組織でケメリンの分泌が見られたという報告があり (Makki ら 2013)、肥大化した脂肪細胞では分泌されたケメリンなどの炎症性物質の影響と考えられるインスリン感受性の低下と炎症反応が見られたという報告がある (Makki ら 2013) 。ケメリンが細胞の増殖・分化および細胞死に影響する報告としては、ケメリンがマウス筋芽細胞の ERK1/2 および mTOR シグナル経路を制御して増殖促進と分化抑制を行うという報告 (Yang ら 2012)、ケメリンがマウス筋芽細胞で筋分化関連遺伝子の発現を抑制し、また、脂質蓄積遺伝子の発現を促進して分化を誘導するという報告 (Li ら 2015) およびケメリンがマウス心筋細胞で AKT シグナル経路を制御することによりアポトーシスを誘導する報告が存在する (Penes ら 2015) 。また、ケメリンがマウス脂肪細胞で脂質蓄積と脂質分解といった脂質代謝を制御するという報告(Fu ら 2016)、ウシ乳腺上皮細胞でケメリン受容体遺伝子発現を増加させ、脂肪酸合成遺伝子、インスリンならびにカゼインに関連する遺伝子発現を増加させるという報告がある (Suzuki ら 2015) 。さらに、CMKLR1 の発現がインスリン・成長ホルモン・プロラクチンにより抑制される可能性も報告されている (Suzuki ら 2015) 。

このような過去の報告より、炎症性物質ケメリンは様々な生理作用を持

っている他、ケメリン受容体を持つ脂肪細胞、筋細胞および乳腺細胞など生体内の他の組織を構成する細胞に影響を及ぼすことが示唆されている。炎症性物質についても脂肪組織から分泌される炎症性物質・アディポカインが同じ脂肪組織から分泌される他の種類のアディポカインの分泌を制御する報告 (Wozniak ら 2009) のほか、ヒト脂肪細胞と骨格筋細胞の共培養下で骨格筋の代謝が脂肪細胞の有無に影響されるといった報告が存在する (Kovalik ら 2011) 。また、ケメリンが様々な組織へ作用し、筋細胞の筋管形成、心筋細胞の細胞死、血管内皮細胞の血管新生、血管収縮および白血球の走化性の誘導に影響を与える可能性について示唆する報告も存在する (Latronico ら 2016) 。これらの結果を総括すると、脂肪と筋肉および乳腺といった多くの組織に対してケメリンが影響を及ぼすことから、ケメリンの作用によるシグナルの応答ネットワークを形成している可能性が考えられるが、明確にされてはいない。

現在、ケメリンの生理作用の解明を目的とした多くの研究が行われているが、それらの実験材料の多くがヒト、マウスの組織と細胞であり (Sell ら 2009, Zhang ら 2014) 、反芻家畜ウシ、ヒツジの組織と細胞を実験材料にした報告は少ない。

### 1.2.3 ケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現を制御する要素

反芻家畜の消化系では、摂取された飼料はルーメン内微生物により分解される。分解された飼料成分から生成された揮発性脂肪酸および様々な炭素鎖数を有する脂肪酸が血液中に移行し体内の各組織・細胞に運ばれ、エネルギー代謝に関与する。脂肪細胞の分化は脂肪細胞分化遺伝子以外に脂質合成遺伝子の発現が関連することが知られている (宋 2012)。また、脂



脂肪細胞の分化はホルモンによる作用のほか、血中栄養素が関与するとされている (Lehr ら 2012)。一方、短鎖脂肪酸から長鎖脂肪酸まで、様々な炭素鎖数を有する脂肪酸はヒツジの体内でエネルギーとなると同時に、これらの脂肪酸が細胞分化関連遺伝子および脂質合成遺伝子の発現を制御し、脂肪組織の発達にも影響することが過去の報告で示唆されている (Ribeiro ら 2000, Poridoli ら 2012)。これらの報告から、ホルモン・アディポカインなどの内分泌物とは異なる物質である、生体内に普遍的に存在する脂肪酸が脂肪細胞の脂質蓄積のほか、分化に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、脂肪酸が脂肪細胞に影響を及ぼす際に、脂肪組織の発達に関連するアディポカインであり脂肪細胞の脂質蓄積および分化に影響を及ぼすケメリンの関与が考えられる (Makki ら 2013, Fu ら 2016)。

1.2.2 で示したケメリンの作用によるシグナルの応答ネットワークの可能性と、前項で述べた脂肪酸がヒツジ脂肪細胞に影響を及ぼす可能性から、筋組織から他の組織・細胞へ影響を与える物質を推定した。泌乳初期の乳牛は栄養素摂取量が要求量を下回る場合、乳汁分泌に必要な養分を充足させるために体組織の動員が行われると考えられている (柴野ら 2002)。それに伴い、筋組織の分解に起因する血中クレアチニン濃度の増加が報告されている (Piccione ら 2012)。これらの報告で、多量のエネルギーを必要とする期間において血中クレアチニン濃度が増加することから、エネルギー源となる脂肪組織にクレアチニンが作用し、脂肪の分解を促進し、糖新生を促して、エネルギー源を作り出す可能性が存在する。クレアチニンは筋組織におけるクレアチンリン酸の代謝産物として知られている (Wyss ら 2000)。クレアチンリン酸は筋細胞の生存と筋組織の維持および筋運動に必要なエネルギー源であり、筋細胞内に多く含まれる。クレア

チニンはクレアチンリン酸がエネルギー源として代謝された後に、血中に継続的に放出される。そのため、血中クレアチニン量は組織量の推定ならびに腎機能のマーカーとして知られている (Rule ら 2009)。しかし、クレアチニンの生理的な機能に関してはあまり知られておらず、多くの不明点が存在している。特に、クレアチニンが生体内の各種の組織・細胞に及ぼす影響については今のところ不明である。

現在では乳腺上皮細胞・筋細胞以外の組織である脂肪組織の脂肪細胞から分泌された炎症性物質が乳腺上皮細胞・筋細胞および脂肪細胞自体に作用し、細胞の代謝、増殖および分化に関する遺伝子の発現を制御することが報告されている (Suzuki ら 2012, Yang ら 2012, Suzuki ら 2015)。これらの報告より、筋細胞から放出される多量のクレアチニンが炎症性物質と同様に様々な組織に影響を与えることが予想できるが、その対象ならびに生理作用は明確にされていない。

## 第2章 ヒツジ脂肪細胞におけるケメリンおよびケメリン受容体遺伝子発現の検討

### 2.1 緒言

肥育期のヒツジにおける体重増加は、主に筋組織および脂肪組織の肥大化によるものである。肉質評価において重要な基準とされている食肉中の脂肪含量は、脂肪組織を構成する前駆脂肪細胞の増殖および分化過程に伴う脂質合成・蓄積によって増加する。脂肪細胞の分化過程には、十分な栄養素供給のほかにも細胞の分化に関連する脂肪細胞分化関連遺伝子の発現が関与している。また、インスリンのような栄養素取り込みに関連するホルモン、さらに脂肪細胞自身から分泌されるアディポカインによる自己調節が深く関与している。アディポカインは脂肪細胞が分泌する生理活性物質として知られており、食欲調節機能を有するレプチンの発見以来、これまで糖代謝、脂質代謝ならびに免疫反応に関連する種々の新奇アディポカインの存在と機能が確認されてきた (Lehr ら 2012)。新奇アディポカインの一つであるケメリンは、その受容体であるケメリン受容体を介して細胞分化、糖の取り込みおよび炎症反応に伴う脂質分解を調節することが、マウス、ウシの培養脂肪細胞を対象とした先行研究により確認されている (Roh ら 2007, Song ら 2010)。さらに、ヒツジ生体を対象とした先行研究ではケメリンの静脈投与が血糖値および血中遊離脂肪酸の濃度に影響を与えることが報告され、ケメリンがヒツジの糖および脂質代謝に関与している可能性が示唆されている (Suzuki ら 2012)。しかし、ヒツジの脂

肪細胞の分化過程におけるケメリン分泌特性およびその影響についてはまだ不明な点が多く残されている。実験 1 は、ヒツジ培養脂肪細胞の分化過程におけるケメリンの遺伝子発現動態およびケメリンの作用を検討したものである。

## 2.2 材料および方法

3 ヶ月齢の去勢サフォーク種 1 頭の皮下から摘出した脂肪組織を直ちに Type I collagenase を 0.5 mg/mL 含む 37°C の DMEM (和光純薬株式会社, 大阪市) 培地で 70 分間処理し、金属メッシュ (60 サイズ) にて濾過、遠心分離 (800 × *g* 2 分間) 後、沈殿した細胞ペレットを基本培地 DMEM (和光純薬株式会社), Fetal Bovine Serum (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) 10%, Antibiotic mixture (和光純薬株式会社) 1% に入れ、再懸濁して前駆脂肪細胞を採取した。培養前駆脂肪細胞は、FBS10% および抗生物質 1% を含む DMEM 培地で 5 日間前培養を行った後、trypsin EDTA 溶液 (和光純薬株式会社) で細胞を回収した。作成した培養前駆細胞は、分化誘導物質無処理区 CON (DMEM : Ham's F-12 = 1:1 (和光純薬株式会社), ITSX (和光純薬株式会社) × 1) および分化誘導処理区 DIF (DMEM : Ham's F-12 = 1:1 (和光純薬株式会社), ITSX (和光純薬株式会社) × 1, rosiglitazone (Life Technologies Corporation) 20 μM, dexamethasone (和光純薬株式会社) 1.25 μM, palmitate (和光純薬株式会社) 100 μM) に分け、2 日ごとに培地交換を行い、12 日間培養を行った。培養開始 0, 7, 12 日目に total RNA を抽出し、RT-PCR 法によりケメリン、ケメリン受容体、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  および

TNF- $\alpha$  の遺伝子発現をリアルタイム PCR 装置 Takara Thermal Cycler Dice TP8000 (タカラバイオ株式会社, 草津) で分析した。遺伝子発現量の調査項目およびプライマーは表 1 に示した。

表 1 遺伝子分析で用いたプライマー

gene	primer	sequence	product size (bp)
PPAR $\gamma$	forward	5' -gataaagcgtcagggttcca-3'	54
	reverse	5' -acccttgcacaccttcacaag-3'	
C/EBP $\alpha$	forward	5' -cgacctgttccaacacagc-3'	85
	reverse	5' -cgggtagtcaaagtcggttg-3'	
chemerin	forward	5' -caggtgaccagcgtagacaa-3'	126
	reverse	5' -ctaccttgcagtctgctttcc-3'	
chemerinR	forward	5' -gcctcctacgaggactaccc-3'	127
	reverse	5' -tcccaaggaggcagataatg-3'	
TNF- $\alpha$	forward	5' -caacatcctctctgcatca-3'	150
	reverse	5' -tattcggcagggttgatctc-3'	
$\beta$ -actin	forward	5' -gtgagaagatgaccagatc-3'	231
	reverse	5' -ggatottcatgaggtagtcc-3'	

ヒツジ培養脂肪細胞に及ぼすケメリンの影響を検討するため、ケメリンをそれぞれ 0, 10, 200 ng/mL の濃度で調製した DMEM : Ham's F-12 = 1:1 培地 (和光純薬株式会社) で処理し、処理開始後 48 時間にオイルレッド法による染色を行い、その後、顕微鏡で観察した。ヒツジ培養前駆脂肪細胞の増殖に及ぼすケメリンの影響を検討する実験として、96well 細胞培養プレートで 1 well 当たり約 2000 個のヒツジ前駆脂肪細胞を分注し、ケメリンを 0, 10, 200 ng/mL の濃度で調製した DMEM : Ham's F-12 = 1:1 培地(和光純薬株式会社)下で 4 日間増殖培養を行った。細胞数の測定は、ケメリン処理開始 48 時間および 96 時間後に行った。測定方法は cell counting kit-8 (同仁堂, 上益城郡) を用いた比色法で、無処理区の吸光度値を基準としてケメリン処理区の吸光度と比較した。

## 2.3 結果および考察

ヒツジ培養脂肪細胞を分化誘導物質無処理培地 CON および分化誘導処理培地 DIF でそれぞれ 12 日間培養し、遺伝子発現量を測定した結果、脂肪細胞分化関連因子である PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の遺伝子発現量は分化誘導処理区において培養開始 12 日で増加し、無処理区と比べ有意に高かった (図 1 (A),(B))。PPAR $\gamma$  は、脂肪細胞分化を促進する様々な分化関連遺伝子を調節するマスターレギュレーターとして脂肪細胞の分化に必須の因子であり、troglitazone、pioglitazone および rosiglitazone などの TZD 系物質の処理により発現が誘導されることが知られている (Spiegelman 1998)。C/EBP $\alpha$  は、脂肪細胞の脂質合成の際に必要とされるグルコースの取り込みに深く関与するインスリンの感

受性を増加させる因子であり、PPAR $\gamma$ と共に脂肪細胞分化の程度を判断する指標とされている (Wu ら 1999)。

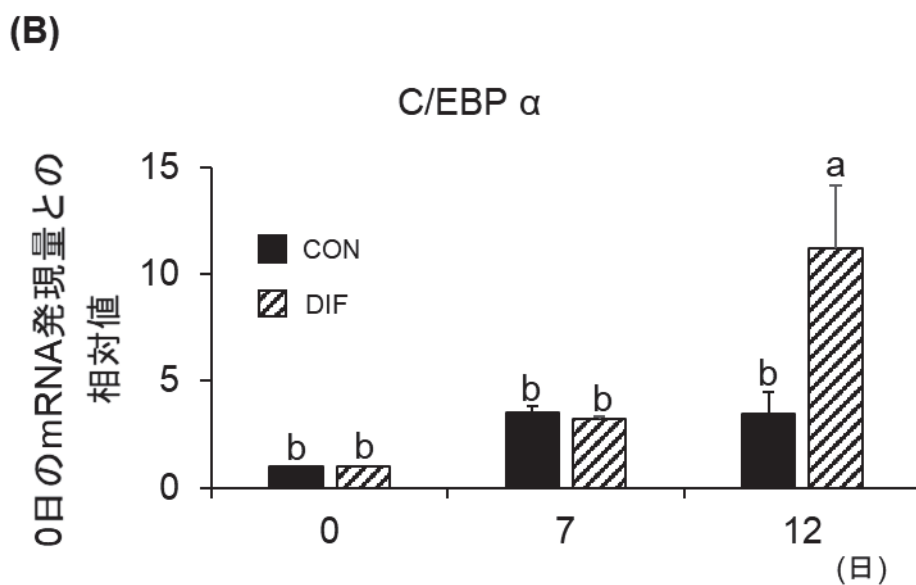
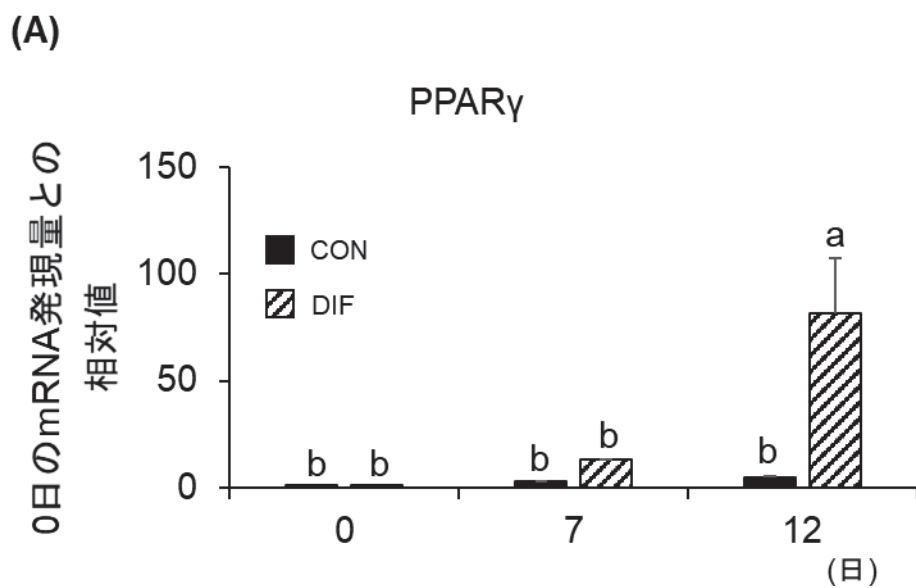


図1 脂肪細胞分化培地で処理した脂肪細胞の脂質合成関連遺伝子の発現

(A) PPAR  $\gamma$

(B) C/EBP  $\alpha$

遺伝子分析を分化誘導後 0, 7, 12 日目に行った。

CON は分化誘導物質無処理区、DIF は分化誘導物質処理区を示す。

a, b は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。



以上の結果から、実験 1 に用いたヒツジ培養前駆脂肪細胞が分化誘導培地の処理により正常に分化したことを確認した後、分化過程におけるケメリン (chemerin) およびケメリン受容体 (chemerinR) の遺伝子発現を検討した。分化誘導培地で処理したヒツジ培養前駆脂肪細胞は、培養日数に伴ってケメリンおよびケメリン受容体の発現が増加する傾向がみられ、分化開始後 12 日においては無処理区と比べ有意に高く発現した (図 2 (A), (B))。さらに、ケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現パターンは図 1 で示した PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の遺伝子発現パターンと同様な発現変動を示したことから、ケメリンおよびケメリン受容体は、脂肪細胞の分化・発達に伴って発現する因子である可能性が示唆された。また、ウシの培養前駆脂肪細胞を対象とした先行研究において、炎症物質である TNF- $\alpha$  の処理によりケメリン受容体遺伝子発現が増加したことから (Song ら 2010)、ヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化過程における TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現を検討した。その結果、ヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化期間中にケメリン受容体の遺伝子発現が最も増加した分化開始後 12 日の分化誘導培地処理区において、TNF- $\alpha$  の遺伝子発現が有意に増加していた (図 2 (C))。この結果から、ケメリン受容体の遺伝子発現は、脂肪細胞分化調節遺伝子である PPAR $\gamma$ ・C/EBP $\alpha$  のほかにも、脂肪細胞分化により発現する TNF- $\alpha$  の自己分泌作用により調節される可能性が考えられた。さらに、脂肪細胞分化後期に高い遺伝子発現を示すケメリンは、同じ時期に増加するケメリン受容体を介して成熟脂肪細胞に影響を及ぼす可能性が考えられた。

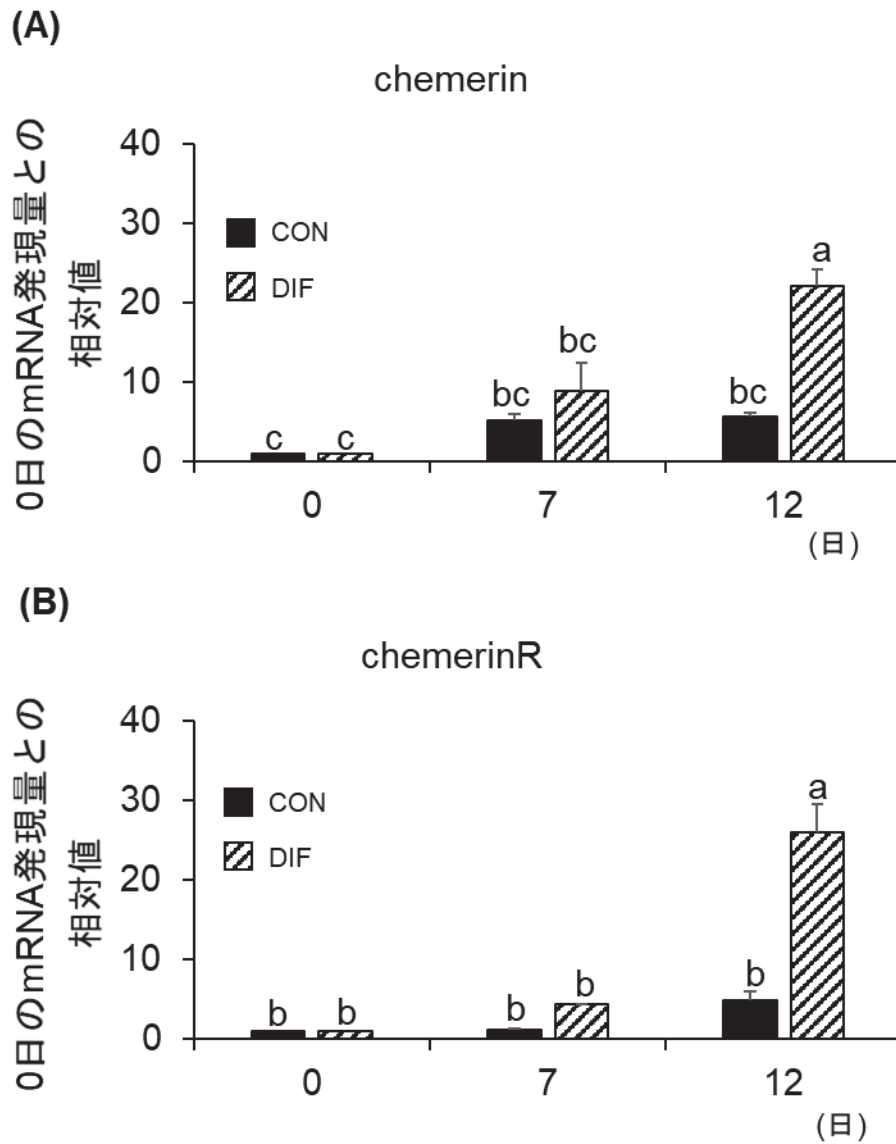


図 2 脂肪細胞分化培地で処理した脂肪細胞の炎症性物質関連遺伝子の発現

- (A) ケメリン
- (B) ケメリン受容体

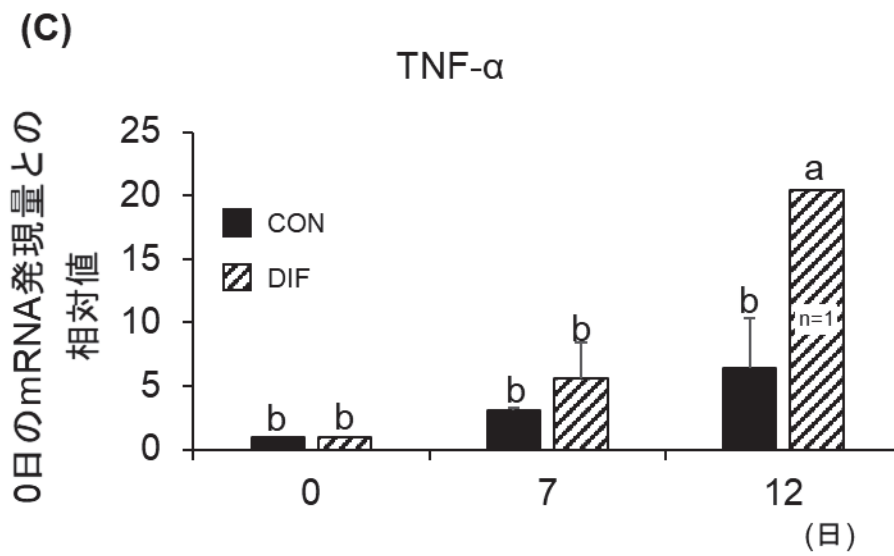


図 2 脂肪細胞分化培地で処理した脂肪細胞の炎症性物質関連遺伝子の発現 (続き)

(C) TNF- $\alpha$

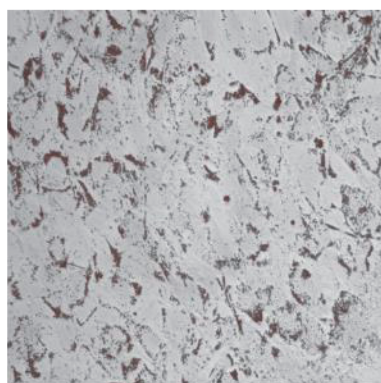
遺伝子分析を分化誘導後 0, 7, 12 日目に行った。

CON は分化誘導物質無処理区、DIF は分化誘導物質処理区を示す。

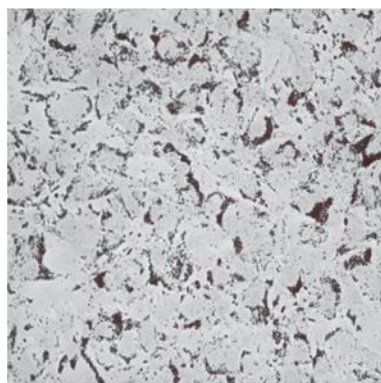
a, b, c は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

成熟脂肪細胞に及ぼすケメリンの影響の検討を目的として分化開始後 12 日のヒツジ培養脂肪細胞にケメリン処理を行った結果、200ng/mL 濃度のケメリン処理によってヒツジ培養脂肪細胞内の脂質が減少したことがオイルレッド染色によって観察された (図 3(A))。マウス脂肪細胞を対象とした Roh らの研究 (2007) では、ケメリン処理によるマウス脂肪細胞での脂質分解を報告している。実験 1 での結果から、ケメリンは発達したヒツジ培養脂肪細胞に対しても脂質分解機能を有することが明らかになった。さらに、増殖中のヒツジ培養前駆脂肪細胞への 200 ng/mL のケメリン処理は、処理開始後 48 時間および 96 時間において無処理区および 10 ng/mL のケメリン処理区と 200 ng/mL ケメリン処理区を比較すると、200 ng/mL ケメリン処理区では細胞数が有意に増加していた (図 3(B))。脂肪細胞の過剰な脂質蓄積は細胞の肥大化を招き、脂肪組織内の酸素分圧が低下することにより最終的には脂肪細胞は細胞死に至る。しかし、脂肪細胞は分化が進行する際に TNF- $\alpha$  のような炎症性物質を自己分泌し、細胞の過剰な肥大化を抑制する機能を有することが考えられる。実験 1 で得られた結果から、ヒツジ培養脂肪細胞の分化期間において新奇アディポカインであるケメリンが分化後期の培養脂肪細胞から分泌され、過剰な肥大化を抑制することが示唆された。また、ケメリンは脂肪組織内に存在する未分化脂肪細胞の増殖を促進し、未分化細胞の増殖に必要とされるエネルギー源である遊離脂肪酸の供給を誘導する機能を持った、脂肪組織の恒常性調節因子の一つである可能性が示唆された。

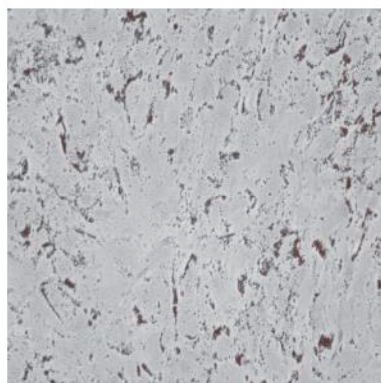
(A)



0



10



200

ケメリン (ng/mL)

図 3 ヒツジ脂肪細胞の脂質分解および増殖に対するケメリン処理の効果  
(A) ケメリン処理 2 日後の成熟脂肪細胞におけるオイルレッド染色の顕微鏡写真 (倍率×200)

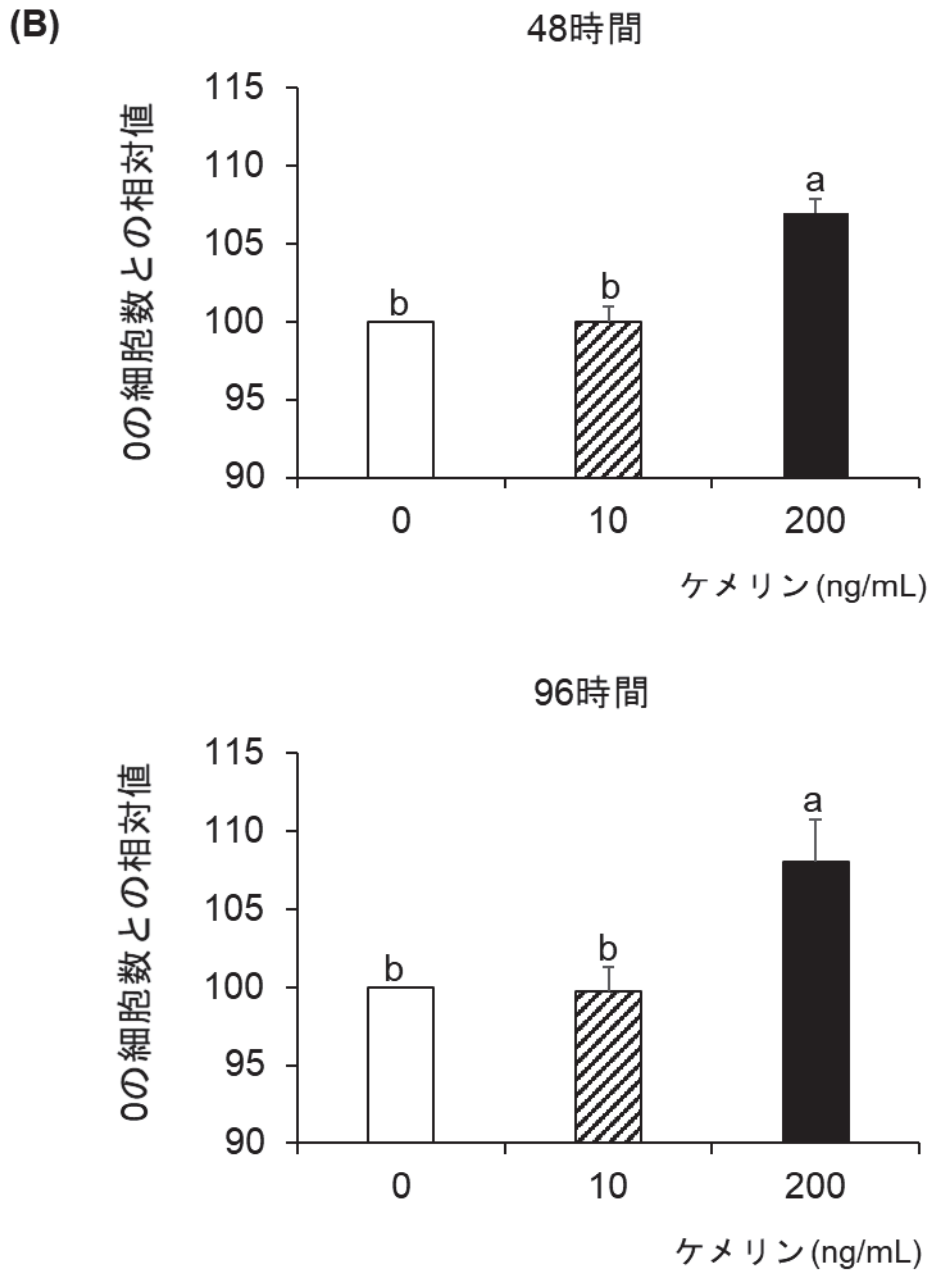


図 3 ヒツジ脂肪細胞の脂質分解および増殖に対するケメリン処理の効果  
(続き)

(B) 上：ケメリン処理 48 時間前駆脂肪細胞の細胞数、下：96 時間の前  
駆脂肪細胞の細胞数

a, b は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 小括

脂肪細胞分化誘導培地で処理したヒツジ培養前駆脂肪細胞におけるケメリンおよびケメリン受容体遺伝子の発現は、培養開始後 12 日で無処理区での発現に比べ有意に高かった。また、脂肪細胞の分化マーカである PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  および炎症性物質である TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現が培養開始後 12 日で増加したため、ケメリンおよびケメリン受容体遺伝子の発現はヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化の進行に伴って増加することが明らかとなった。さらに、ヒツジ培養成熟脂肪細胞におけるケメリン (200 ng/mL) 処理は成熟脂肪細胞内の脂質を減少させ、培養前駆脂肪細胞の分裂を促進させた。

この実験により、ヒツジ培養前駆脂肪細胞においてケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現は分化・成熟に伴って増加することが明らかとなった。また、ケメリンはヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解の誘導および前駆脂肪細胞の増殖を促進することが明らかになった。実験 1 で得られた結果から、ケメリンは脂肪細胞の増殖および恒常性維持を通じて脂肪組織の発達に関与する因子であることが示唆された。

## 第 3 章 異なる脂肪酸処理がヒツジ前駆脂肪細胞の脂質蓄積および分化に及ぼす影響

### 3.1 緒言

産肉動物という側面から、ヒツジの肥育効率向上は、肉用ヒツジ飼育における最大の目的である。肥育期に伴う体重の増加は体組織に存在する細胞の発達によるものであり、肉を構成する筋細胞および脂肪細胞の増殖と分化の促進は肥育効率向上に密接に関連している。さらに、肉の風味・食感を左右する脂肪含量は肉質評価において重要な評価基準とされ、脂肪組織発達の制御技術確保は食肉生産に貢献できるものである。脂肪組織に含まれている脂肪は前駆脂肪細胞と呼ばれる未分化脂肪細胞の分化過程における脂質合成により産生される。動物体内における脂肪細胞の分化は、PPAR $\gamma$ ・C/EBP $\alpha$ などの脂肪細胞分化因子のほか、aP2のような脂質合成因子の発現、ホルモンによる内分泌作用の他にも、消化管から吸収され血中に反映されたグルコース、脂肪酸およびアミノ酸などの様々な栄養素が関与する (Roh ら 2006)。さらに、ルーメン内微生物の作用により生成される揮発性脂肪酸および様々な炭素鎖数を有する脂肪酸がヒツジ体内エネルギー代謝に関与することが知られており、脂肪酸がヒツジ脂肪組織の発達にも影響することが考えられるが、これらの脂肪酸が前駆脂肪細胞の脂質蓄積ならびに分化に及ぼす詳細な情報はまだ不十分である。したがって本章で行う実験 2 では、異なる炭素鎖数を有する脂肪酸がヒツジ脂肪細胞の発達に及ぼす影響を解明する為、炭素鎖数を基準として分類した



10 種類の脂肪酸をそれぞれヒツジ培養前駆脂肪細胞に処理し、脂質蓄積および分化に及ぼす影響を検討した。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 培養ヒツジ前駆脂肪細胞の作成

14 ヶ月齢のサフォーク系雑種去勢ヒツジから脂肪組織を採取し、10% Fetal Bovine Serum (Life Technologies Corporation) を含んだ DMEM (和光純薬株式会社) に入れ他の結合組織から分離し、Type 1 コラゲナーゼ (和光純薬株式会社) 0.5 mg/mL を含む DMEM 培地(和光純薬株式会社)中で 37°C で 70 分間浸し消化した。消化された組織は、ステンレス鋼メッシュ (60 サイズ) で濾過し、遠心分離 (800×*g* 2 分間) 後、沈殿した細胞ペレットを基本培地 DMEM (和光純薬株式会社) , Fetal Bovine Serum (Life Technologies Corporation) 10%, Antibiotic mixture (和光純薬株式会社) 1% に入れ、再懸濁した。DMEM 培地 (和光純薬株式会社) を含む 100 mm 直径ディッシュに再懸濁された細胞を分注し、2 日後、0.5% トリプシン溶液 (和光純薬株式会社) で処理することにより、前駆脂肪細胞を回収した。

### 3.2.2 培養前駆脂肪細胞への脂肪酸処理

細胞単離法により作成したヒツジ前駆脂肪細胞を、細胞培養用容器に分注し、細胞密度が約 80% に到達するまで基本培地で培養を行った。その後、Fetal Bovine Serum (Life Technologies Corporation) 10%、ITSX (和光純薬株式会社) ×1、dexamethasone (和光純薬株式会社) 1.25 μM を含

む分化培地（脂肪酸無処理区 CON）および、分化培地に、短鎖脂肪酸（SCFA として、酢酸ナトリウム S1（和光純薬株式会社）、プロピオン酸ナトリウム S2（和光純薬株式会社）、酪酸ナトリウム S3（和光純薬株式会社）、乳酸ナトリウム S4（和光純薬株式会社））、中鎖脂肪酸（MCFA として、オクタン酸ナトリウム M1（和光純薬株式会社）、デカン酸ナトリウム M2（和光純薬株式会社））、長鎖脂肪酸（LCFA として、パルミチン酸ナトリウム L1（和光純薬株式会社）、リノール酸ナトリウム L2、オレイン酸ナトリウム L3（和光純薬株式会社）およびステアリン酸ナトリウム L4（和光純薬株式会社））をそれぞれ 100  $\mu$ M の濃度で調製した脂肪酸処理分化培地（脂肪酸処理区 DIF）で 6 日間培養を行った。

### 3.2.3 脂質蓄積および遺伝子発現の調査

脂肪酸無処理区 CON および脂肪酸処理区 DIF の細胞を、2 日ごとに培地交換を行い、培養 6 日後、ホルマリン固定および total RNA 抽出を行った。ホルマリンで固定された両区の細胞を、60%のオイルレッド溶液で 5 分間染色し、PBS で 2 回洗浄後、EVOS Cell Imaging Station (Life Technologies Corporation) を用いて倍率 $\times$ 200 で観察した。その後、イソプロパノールで色素を抽出し、光波長 520nm に設定した分光光度計を使用して吸光度から蓄積脂肪を測定した。抽出した total RNA を RT-PCR 法により脂肪細胞分化関連遺伝子 PPAR  $\gamma$  , C/EBP  $\alpha$  , 脂質合成遺伝子 aP2 および炎症関連遺伝子ケメリン、TNF- $\alpha$  の発現量をリアルタイム PCR 装置 Takara Thermal Cycler Dice TP8000 (タカラバイオ株式会社) を用いて測定した。遺伝子発現のプライマーは表 2 に示した。

表 2 遺伝子分析で用いたプライマー

gene	primer	sequence	product size (bp)
PPAR $\gamma$	forward	5' -gataaagcgtcagggttcca-3'	54
	reverse	5' -acccttgcatccttcacaag-3'	
chemerin	forward	5' -caggtgaccagcgtagacaa-3'	126
	reverse	5' -ctaccttgcaagtctgctttcc-3'	
TNF- $\alpha$	forward	5' -caacatcctctctgccatca-3'	150
	reverse	5' -tattccggcaggttgatctc-3'	
C/EBP $\alpha$	forward	5' -cgacctgttccaacacagc-3'	85
	reverse	5' -ccggtagtcaaagtcgttgc-3'	
aP2	forward	5' -tcagtgtaaatggggatgtg-3'	161
	reverse	5' -ttgtacttgtaccagagcac-3'	
$\beta$ -actin	forward	5' -gtgagaagatgaccagatc-3'	231
	reverse	5' -ggatcttcatgaggtagtcc-3'	

### 3.2.4 統計分析

各処理区における脂肪蓄積および遺伝子発現量の差の検定はエクセル統計(BellCurve for Excel)を用いた。各群間に対する一元分散分析を行い、一元分散分析での差の検定は Tukey-Kramer の多重比較法により行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 3.3 結果および考察

異なる 10 種類の脂肪酸処理がヒツジ培養前駆脂肪細胞の脂質蓄積に及ぼす影響を図 4 に示した。培養開始 6 日後、無処理区を含む全処理区において、細胞内脂肪滴形成が観察され、その中でも LCFA であるパルミチン酸ナトリウムを処理した細胞の脂肪滴の量およびサイズがほかの処理に比べ最も増加した (図 4 (A))。オイルレッド染色の色素抽出による細胞内脂肪含量の測定結果でも、パルミチン酸ナトリウム処理区の細胞内脂肪蓄積量は、無処理区および他の脂肪酸処理区と比べ、有意に高い細胞内脂肪蓄積量を示した。パルミチン酸ナトリウム処理区を除いた全ての脂肪酸処理区および無処理区においては、脂肪酸の違いによる細胞内脂肪含量の差はほとんど見られなかった (図 4 (B))。

(A)

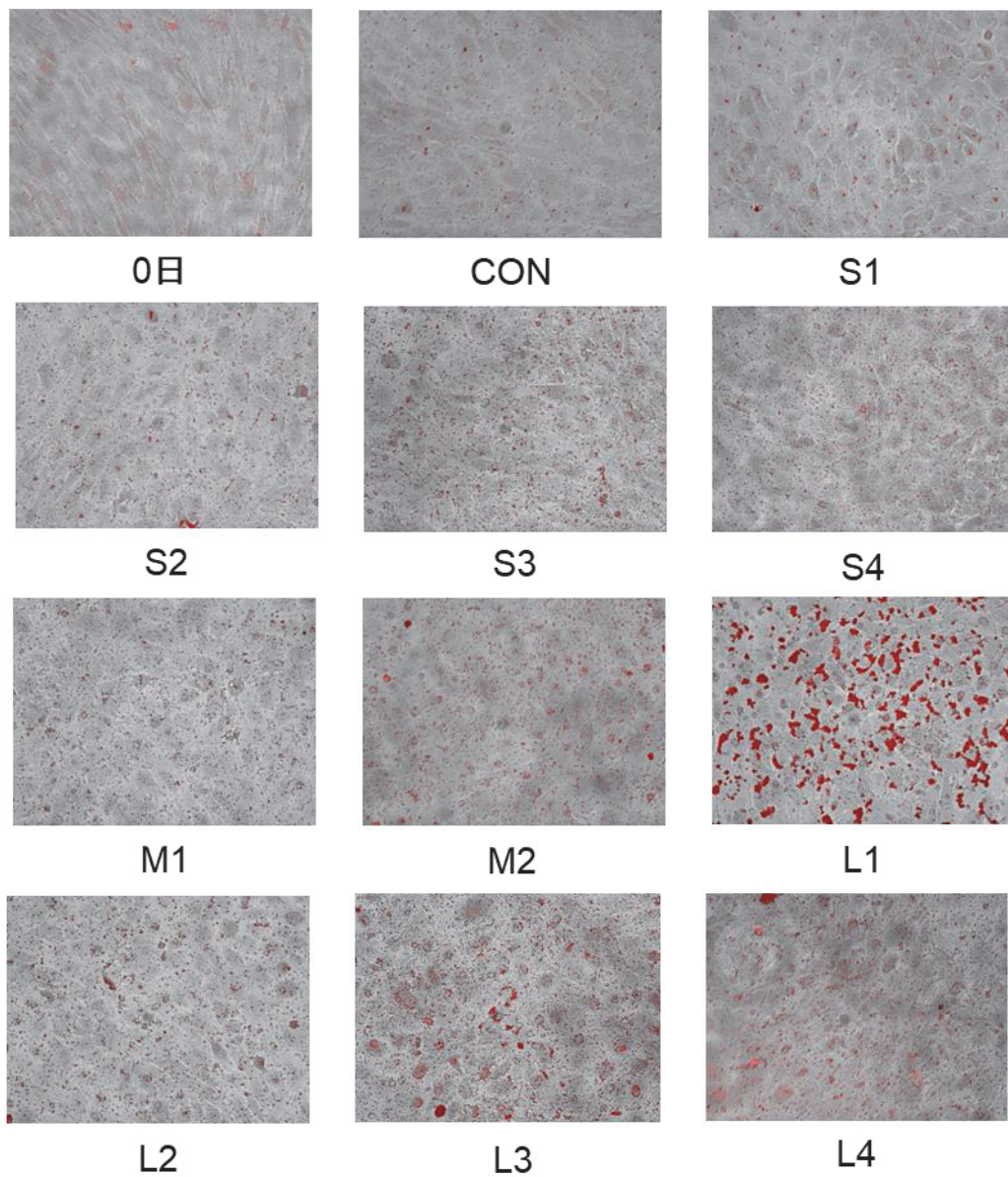


図4 100  $\mu$ M 脂肪酸処理によるヒツジ脂肪細胞の分化過程の脂質蓄積  
(A) オイルレッド染色の顕微鏡写真 (倍率 $\times$ 200)

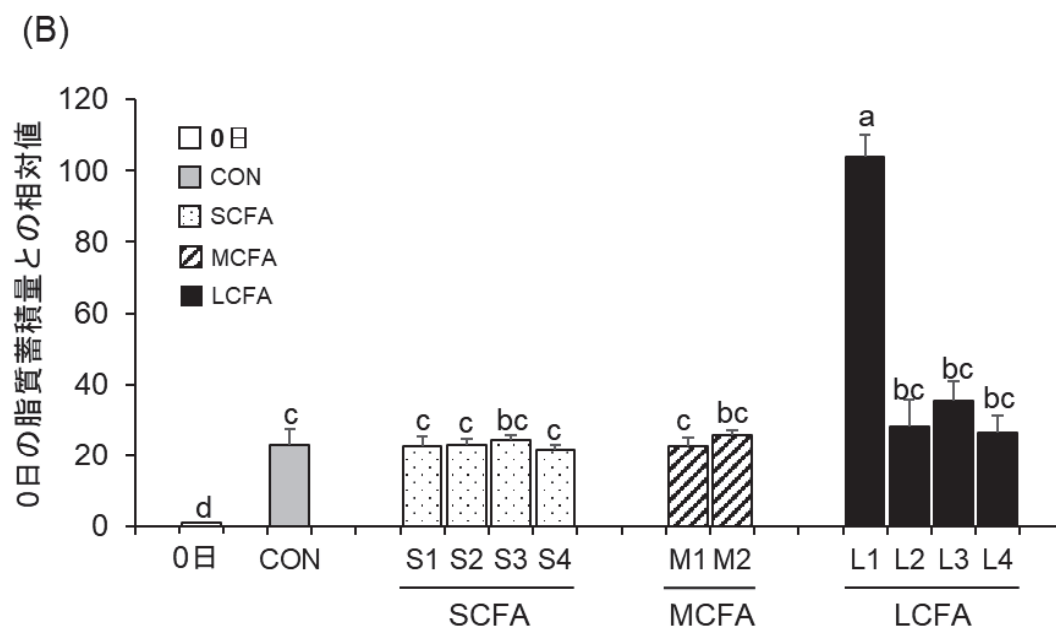


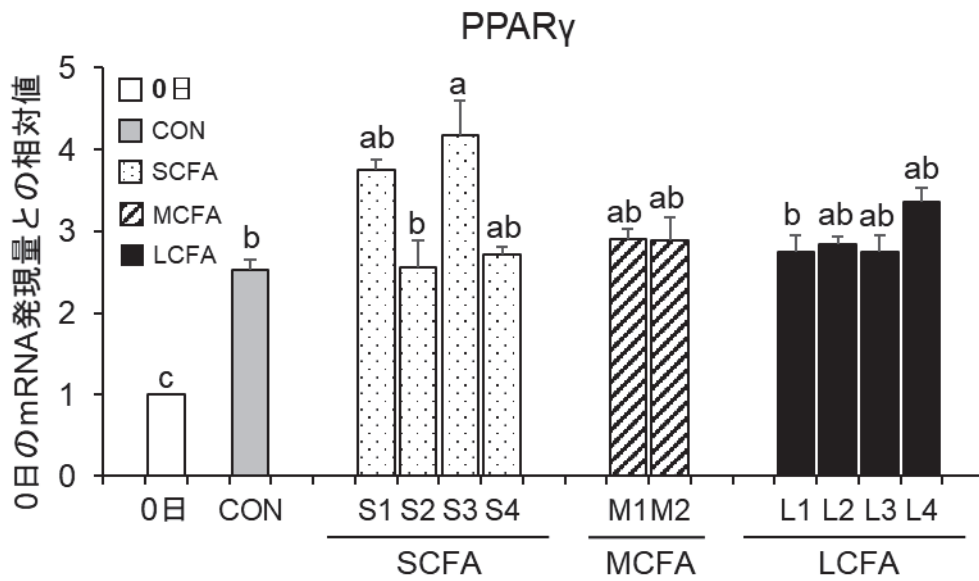
図 4 100  $\mu$ M の脂肪酸処理によるヒツジ脂肪細胞の分化過程の脂質蓄積 (続き)

(B) オイルレッド染色抽出液に対する、分光光度計を用いた脂質量測定  
脂肪酸処理 0 日目および 6 日目の脂肪細胞を用いた。

a, b, c, d は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

さらに、脂肪細胞分化因子である PPAR $\gamma$  の遺伝子の発現量は、SCFA である酪酸ナトリウムの処理区で培養開始時と比べて増加し、無処理区と比べて有意に発現量が増加したが、脂質蓄積量の調査結果とは一致しなかった (図 5 (A))。PPAR $\gamma$  とともに、脂肪細胞分化因子として知られている C/EBP $\alpha$  の遺伝子の発現量は、LCFA であるパルミチン酸ナトリウムおよびステアリン酸ナトリウム処理区において、無処理区と比べ、有意に増加した (図 5 (B))。さらに、脂質合成に関連する aP2 の遺伝子の発現量は、パルミチン酸ナトリウム処理区において、無処理区および他の脂肪酸処理区と比べ有意に高い値を示しており (図 5 (C))、パルミチン酸の処理により増加した細胞内脂質蓄積量の結果と一致した。これらの結果は、ヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化過程における PPAR $\gamma$  の遺伝子および C/EBP $\alpha$  の遺伝子の発現量が細胞内脂肪蓄積量が最大となる前に高い発現を示し、aP2 の遺伝子の発現が分化後期に最も高くなった Kim らの研究報告 (2015) と同様な結果であった。さらに、Polidori らは、パルミチン酸がマウスの未分化細胞で GPR120 を介し、脂肪細胞への分化を誘導することを報告しており (2012)、パルミチン酸ナトリウムの処理により脂質蓄積が増加したヒツジ脂肪細胞にも、GPR120 のような受容体を媒介する脂質蓄積機構が存在する可能性が考えられる。

(A)



(B)

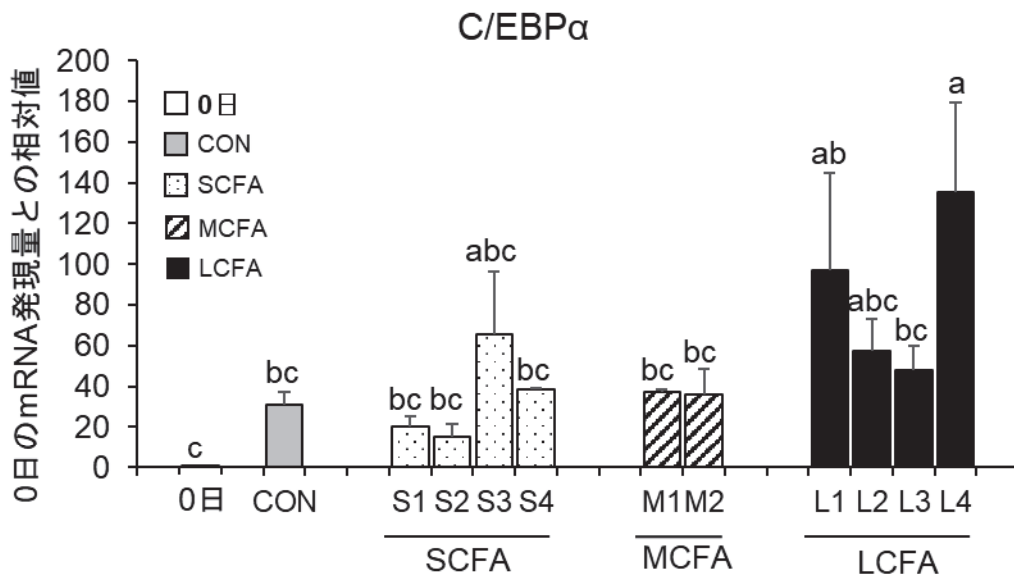


図 5 100  $\mu$ M の脂肪酸処理によるヒツジ脂肪細胞の分化過程の遺伝子発現

(A) PPAR $\gamma$

(B) C/EBP $\alpha$



(C)

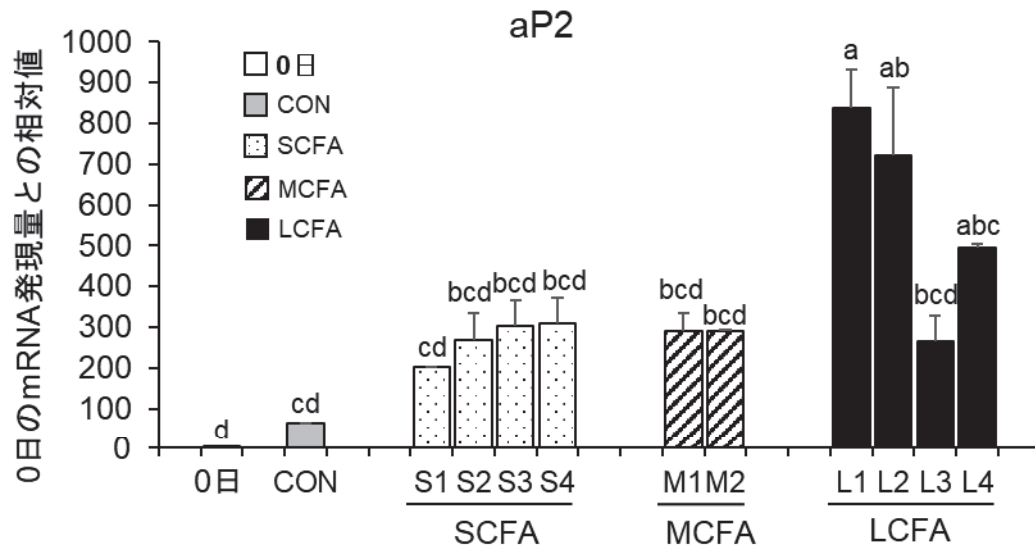


図 5 100  $\mu$ M の脂肪酸処理によるヒツジ脂肪細胞の分化過程の遺伝子発現 (続き)

(C) aP2

脂肪酸処理 0 日目および 6 日目の脂肪細胞を用いた。

a, b, c, d は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

一方、脂肪細胞は、TNF- $\alpha$ ・ケメリンなどの炎症関連因子を分泌し、脂肪細胞の脂質蓄積を抑制することが知られている。異なる脂肪酸処理が炎症関連因子の発現に及ぼす影響の調査では、ケメリンの遺伝子の発現はオレイン酸ナトリウムを除いた全ての脂肪酸処理区において無処理区と比べて有意に増加し（図 6 (A)）、脂肪酸がケメリンの遺伝子の発現を誘導している可能性が示唆された。さらに、酢酸ナトリウム処理が TNF $\alpha$  の遺伝子の発現量増加を誘導し（図 6 (B)）、マウス生体を対象とした Ribeiro らの研究報告（2000）と類似な結果となった。

これまでのウシおよびヒツジを対象として行われた多数の研究は、揮発性脂肪酸を含むルーメン内脂肪酸合成量の増加が肥育向上に直結し、さらに、脂肪酸の血中投与が血中インスリン濃度の増加を誘導すると報告している。しかし、本章で行った実験 2 で用いられた細胞培養実験はヒツジ生体に存在する脂肪組織以外の器官の影響を排除した環境で行われたものであり、用いた 10 種類のうち 9 種類の脂肪酸は、ヒツジ培養前駆脂肪細胞の脂質蓄積を誘導せず、一部の脂肪酸だけが脂肪細胞の脂質合成および細胞分化に直接影響を与えた。以上のことから、ヒツジのルーメン内で生成された様々な脂肪酸は脂肪細胞の脂質合成ならびに分化過程にほぼ関与せず、糖新生機構を介して脂肪細胞の脂質合成に必要とするエネルギー源として利用される可能性が存在する。また、一部の脂肪酸は、脂肪細胞の炎症物質（ケメリン・TNF- $\alpha$ ）分泌を調節することが明らかになった。

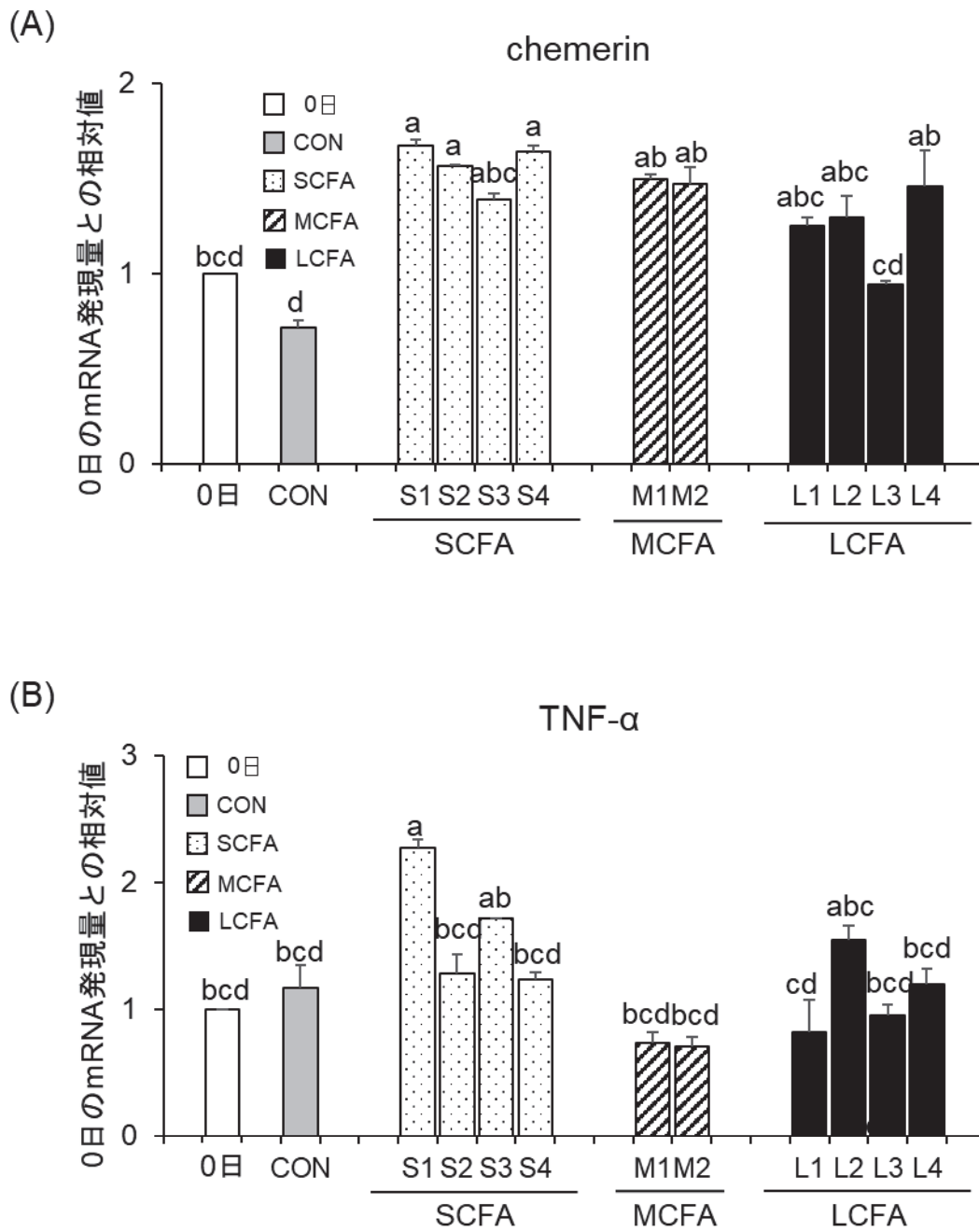


図 6 100  $\mu$ M の脂肪酸処理によるヒツジ脂肪細胞の分化過程の遺伝子発現

(A) ケメリン

(B) TNF- $\alpha$

脂肪酸処理 0 日目および 6 日目の脂肪細胞を用いた。

a, b, c, d は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

### 3.4 小括

異なる炭素鎖数の脂肪酸処理がヒツジ培養前駆脂肪細胞の脂質蓄積および分化過程に及ぼす影響を検討した。ヒツジから単離した培養前駆脂肪細胞を 10 種類の脂肪酸を濃度 100  $\mu\text{M}$  に調製した分化培地で培養を行ったところ、パルミチン酸処理区で無処理区と比べて有意に脂質蓄積量が増加し、脂質合成関連因子である aP2 の遺伝子の発現が増加した。しかし、脂肪細胞の分化関連因子である PPAR  $\gamma$  および C/EBP  $\alpha$  の遺伝子の発現は増加しなかった。さらに、ケメリンの遺伝子の発現はオレイン酸を除く 9 種類の脂肪酸処理で有意に増加した。また、TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現は酢酸処理区で増加した。

これらの結果から、ルーメン内微生物の作用により生成される揮発性脂肪酸および様々な炭素鎖数からなる脂肪酸は、脂肪細胞の脂質蓄積ならびに分化に対して直接的な影響を及ぼさず、エネルギー源として脂肪細胞に利用されることが示唆された。一方、本章で行った実験 2 で用いた大部分の脂肪酸がケメリンの遺伝子発現を促進することから、ケメリンはヒツジ前駆脂肪細胞の脂質蓄積ならびに分化の進行を介さずに脂肪酸処理によって分泌が促進されることが示唆された。また、ケメリンは前駆脂肪細胞の分化を誘導する作用を持つことから、ケメリンはヒツジ体内に存在する脂肪酸によって前駆脂肪細胞の分化を促進し、脂肪組織の発達に関与する因子であることが示唆された。

## 第 4 章 クレアチニンがヒツジ成熟脂肪細胞のケメリン・ケメリン受容体遺伝子発現に及ぼす影響

### 4.1 緒言

クレアチニンの生理機能が未解明であることはすでに第 1 章で述べたが、具体的に脂肪細胞に対してどのような影響を与えるかを、ヒツジ培養脂肪細胞を材料として研究した。

クレアチニンはクレアチンの代謝産物として知られている。クレアチンは肝臓で生合成され、筋細胞でクレアチンリン酸に変わる。クレアチンリン酸は筋組織の保全および筋肉運動のために筋組織で使われ、クレアチニンが代謝産物として放出される (Kim ら 2016, Wyss ら 2000)。

筋組織のエネルギー源はグルコースと脂肪酸であるが、クレアチンは筋細胞で代謝のために必要である。過去の報告では血中クレアチニン量は組織の量に比例し、筋組織が分解されることで血中クレアチニン量が増加することを示唆する報告も存在する (Rule ら 2009)。また、泌乳初期の乳牛は栄養素摂取量が要求量を下回る場合、乳汁分泌に必要な養分を充足させるために体組織の動員が行われると考えられ、筋組織の分解に起因すると考えられる血中クレアチニン濃度の増加が報告されている (柴野ら 2002, Piccione ら 2012)。乳牛の筋組織が泌乳期において乳汁分泌に必要な栄養のために分解され、血液のクレアチニン濃度が増加することが示唆されている (Piccione ら 2012)。

これらの報告から、クレアチニンが多量にエネルギーを必要とする期間

において増加したため、クレアチニンはエネルギー源となる脂肪組織に影響を及ぼす可能性が考えられた。そのため、ヒツジ培養前駆脂肪細胞に対するクレアチニンの作用を調査することによって、分化後のヒツジ培養脂肪細胞での脂質分解に関するクレアチニンの影響を検討した。ヒツジ培養前駆脂肪細胞は、培養後に成熟脂肪細胞に分化する。ヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化に関する報告では分化刺激後 10-15 日で成熟脂肪細胞に分化すると述べている (Suzuki ら 2012, Fu ら 2016)。しかし、本章で行った実験 3 ではヒツジ培養前駆脂肪細胞は分化刺激後 18 日で成熟した脂肪細胞に分化した。

脂肪細胞の脂質分解は、過去の報告でさまざまな手法を使用して研究されている。これらの報告では、培養の状態およびアディポカイン以外の物質の処理が脂肪細胞の脂質分解に影響することを示唆している (Harman ら 2001, Park ら 2017)。

PPAR- $\gamma$ 2 は細胞中の脂肪蓄積のマスターレギュレーターであることが知られている。そして、PPAR- $\gamma$ 2 は反芻家畜の脂肪細胞の分化のマスターレギュレーターとしても明らかになっている (Roh ら 2006)。

アディポカインとして知られる TNF- $\alpha$ 、ケメリンとケメリン受容体は、脂質分解に関連した既知の遺伝子である (Roh ら 2006)。ケメリンは受容体を通して、筋細胞と脂肪細胞において脂質蓄積・脂質分解などの脂質代謝に影響を及ぼすことが報告されている (Ormond ら 2007, Song ら 2010, Suzuki ら 2012, Yang ら 2012)。クレアチニンがこれらのケメリンの作用を介してヒツジ培養脂肪細胞の脂質分解に間接的に影響を及ぼす可能性がある。そのため、オイルレッド染色による観察ならびにリアルタイム PCR 装置を使用したケメリン・ケメリン受容体の遺伝子発現の分

析を行い、ヒツジ成熟培養脂肪細胞のケメリン・ケメリン受容体の遺伝子発現へのクレアチニンの効果を検討した。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 ヒツジ培養前駆脂肪細胞の培養

本章で行う実験 3 に用いる 6well 細胞培養プレートにヒツジ培養前駆脂肪細胞を播種し、細胞増殖培地 (DMEM (和光純薬株式会社) , Fetal Bovine Serum (Life Technologies Corporation) 10%, Antibiotics mixture (和光純薬株式会社) 1%) により培養した。培養条件は CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定した。

細胞面積がコンフルエント状態に達した状態で分化誘導培地 (Hi-Glucose no L-glutamine (和光純薬株式会社) , Fetal Bovine Serum 10%, Antibiotics mixture (和光純薬株式会社) 1%, L-glutamine (和光純薬株式会社) 584 mg/L, Sodium Pyruvate (Lonza, Basel, Switzerland) 100 mM, ITSX (和光純薬株式会社) 10  $\mu$  g/mL, Dexametazon (和光純薬株式会社) 1  $\mu$  M, IBMX (和光純薬株式会社) 0.5 mM, Troglitazon (和光純薬株式会社) 10  $\mu$  M, Acetic Acid (和光純薬株式会社) 1 mM) による分化誘導を行った。

クレアチニンの作用を検討するため、2 日ごとに培地交換を行った培養 18 日後の培養脂肪細胞を実験材料として使用した。ヒツジ成熟培養脂肪細胞に対する分化誘導培地の影響を回避するために培地には分化誘導培地ではない構成 (DMEM (和光純薬株式会社) 、Fetal Bovine Serum (Life Technologies Corporation) 10%、Antibiotics mixture (和光純薬株式会

社)1%) を用い、各濃度のクレアチニン処理後 24 時間と 72 時間で分析を行った。

#### 4.2.2 オイルレッド染色

分化刺激後 0, 2, 10, 18 日のヒツジ培養脂肪細胞、およびクレアチニン処理後 24 時間と 72 時間のヒツジ成熟培養脂肪細胞の各サンプルを 2%ホルマリンで固定後、各サンプルを低温室で保存し、全サンプルを取得した後、オイルレッド過飽和イソプロパノール溶液 (0.5%) と PBS を 3:2 の比率で混合した染色液を用いて 4°C で一晩静置した。染色したサンプルの脂肪滴の量を顕微鏡下で倍率×400 で観察し、その後、イソプロパノール (2 mL/サンプル) で色素を抽出し、光波長 520nm に設定した分光光度計を使用して吸光度から蓄積脂肪量を測定した。

#### 4.2.3 クレアチニン処理

脂質分解に関するクレアチニンの作用を調査するために、成熟ヒツジ脂肪細胞の 0 日のサンプルを各濃度のクレアチニンで処理した。クレアチニン処理濃度はヒツジの平常時の血中クレアチニン濃度 (0.01-0.02 mg/mL) を参考に 0.00, 0.02, 0.20, 2.00 mg/mL に設定した。

クレアチニン処理後 24 時間と 72 時間のサンプルについて、前述のオイルレッド染色法によりヒツジ培養脂肪細胞の脂肪滴を染色し、顕微鏡下で観察した。また、抽出液を分光光度計で比色分析し、染色レベルを比較した。顕微鏡下での観察と分光光度計を用いた比色分析により、ヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解に関するクレアチニンの作用を検討した。



#### 4.2.4 遺伝子分析

Total RNA は培養した細胞から RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社) を用いて抽出し、PrimeScript™ RT Reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて total RNA を逆転写し cDNA を合成した。SYBR Premix Ex Taq™ II キット (タカラバイオ株式会社) を用いた RT-PCR 法により、PPAR- $\gamma$  2, TNF- $\alpha$ , ケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現をリアルタイム PCR 装置 Takara Thermal Cycler Dice TP8000 (タカラバイオ株式会社) で分析した。遺伝子発現量の調査項目およびプライマーは表 3 に示す。

表 3 遺伝子分析で用いたプライマー

gene	primer	sequence	product size (bp)
chemerin	forward	5'-caggtgaccagcgtagacaa-3'	126
	reverse	5'-ctaccttgacagtctgctttcc-3'	
chemerinR	forward	5'-gcctcctacgaggactaccc-3'	127
	reverse	5'-tcccaaggaggcagataatg-3'	
TNF- $\alpha$	forward	5'-caacatcctctctgccatca-3'	150
	reverse	5'-tattccggcaggttgatctc-3'	
PPAR $\gamma$	forward	5'-gataaagcgtcagggttcca-3'	54
	reverse	5'-acccttgcatccttcacaag-3'	
$\beta$ -actin	forward	5'-gtgagaagatgaccagatc-3'	231
	reverse	5'-ggatcttcatgaggtagtcc-3'	

#### 4.2.5 統計解析

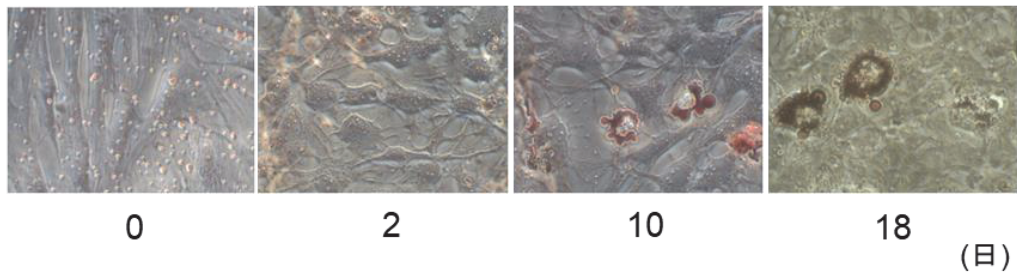
実験データは、エクセル統計 (BellCurve for Excel) を用い、一元配置分散分析における Tukey-Kramer 法を用いて分析した。Tukey-Kramer 法を使用して、各サンプリング時のグループ間の差異を検定した ( $P < 0.05$ )。

### 4.3 結果および考察

#### 4.3.1 ヒツジ培養前駆脂肪細胞の培養と分化

ヒツジ培養前駆脂肪細胞を、クレアチニン無添加の培地で培養した後、0 日目、2 日目、10 日目および 18 日目にオイルレッド染色を行い、顕微鏡下で観察した。これらの細胞は脂肪細胞に徐々に分化し、それぞれの期間で細胞内に脂肪滴を蓄積した (図 7 (A))。成熟したヒツジ培養脂肪細胞はオイルレッドで染色された多数の大きな脂肪滴を含んでいた。培養 18 日後、ウェル中の多数の細胞は大きな脂肪滴を含んでいた。また、分化の過程は分光光度計を用いて抽出液の染色レベルを測定することによっても確認された (図 7 (B))。これらのことから、ヒツジ培養脂肪細胞が培養後 18 日目の時点で成熟していることが明らかになった。

(A)



(B)

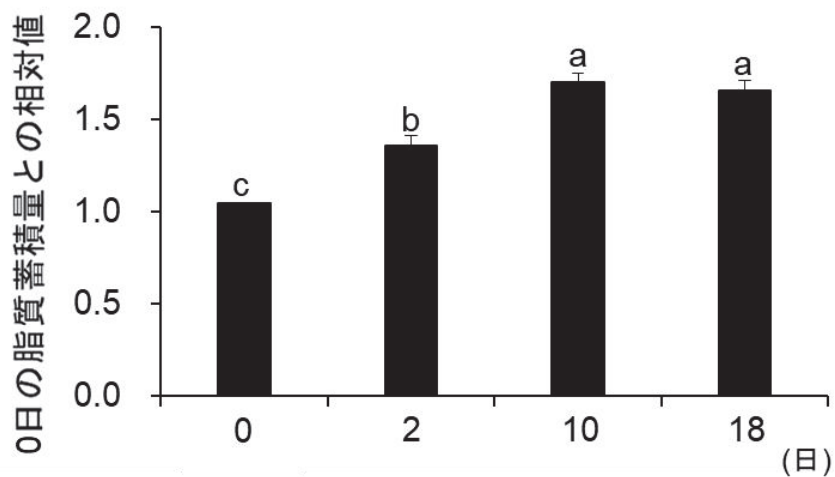


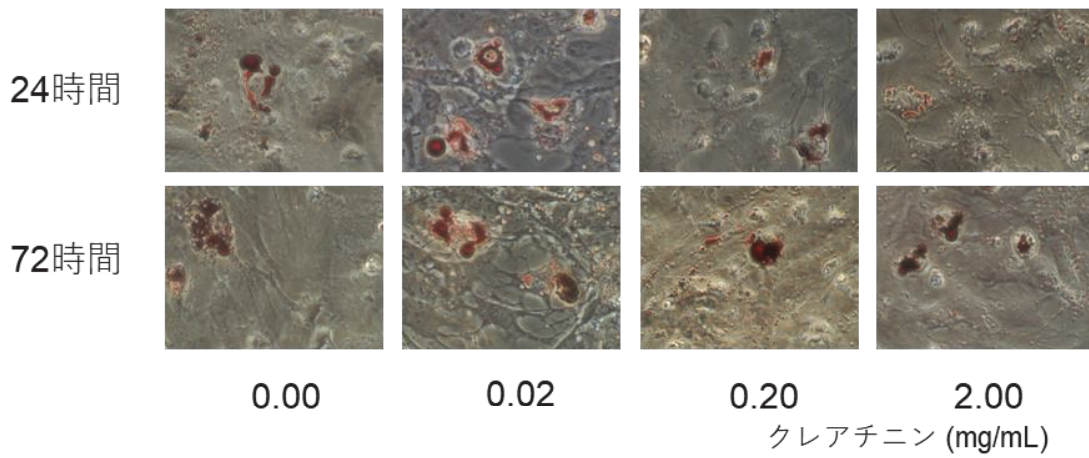
図7 クレアチニン無処理ヒツジ脂肪細胞の成熟過程を示す顕微鏡写真  
(A) 分化開始から0, 2, 10, 18日にオイルレッドによって染色された脂肪細胞 (ヒツジ培養前駆脂肪細胞) の顕微鏡写真 (倍率×400)  
(B) オイルレッド染色抽出液に対する、分光光度計を用いた脂質量測定

図は各日 (0, 2, 10, 18 日) 時点の脂質蓄積量の差を示している。  
写真とグラフ下部の数字は分化開始からの日数を表す。  
a, b, c はグループ内の各点間の有意差を表す ( $P < 0.05$ )。

#### 4.3.2 ヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解に対するクレアチニンの作用

ヒツジ成熟培養脂肪細胞に対するクレアチニンの作用を、培養後 18 日のサンプルを対照実験として用いて検討した。ヒツジ成熟培養脂肪細胞のサンプルを各クレアチニン濃度 (0.02、0.20 および 2.00 mg/mL) で処理し、24 時間および 72 時間後にオイルレッド染色により観察した。24 時間後、細胞内の脂肪滴は、オイルレッド染色による観察では濃度依存的に減少しているように見えた (図 8 (A))。これらの顕微鏡観察の結果は、クレアチニンがヒツジ成熟培養脂肪細胞に対して脂質分解の活性化を誘導することを形態学的に実証した。脂肪滴の染色レベルがクレアチニンの濃度依存的な減少を示すことは、分光光度計を用いた各サンプルの染色レベルの比較によっても明らかとなった (図 8 (B), (C))。クレアチニン処理後 72 時間のサンプルにおいて、顕微鏡観察およびオイルレッド染色レベルの比較 (図 8 (A), (C)) によって、24 時間での脂肪滴の減少のパターンと同様の結果が示され、クレアチニンの脂肪滴減少に及ぼす影響が明らかとなった。

(A)



(B)

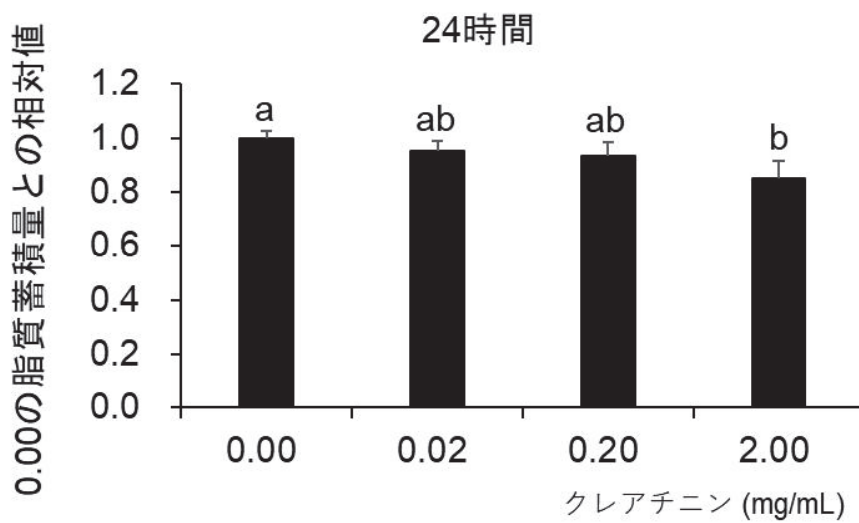


図 8 ヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解に対するクレアチニンの作用  
(A) クレアチニン処理 24, 72 時間後のオイルレッド染色されたヒツジ成熟脂肪細胞の顕微鏡写真 (倍率×400)

(B) クレアチニン処理 24 時間後のオイルレッド染色抽出液に対する、分光光度計を用いた脂質量測定

(C)

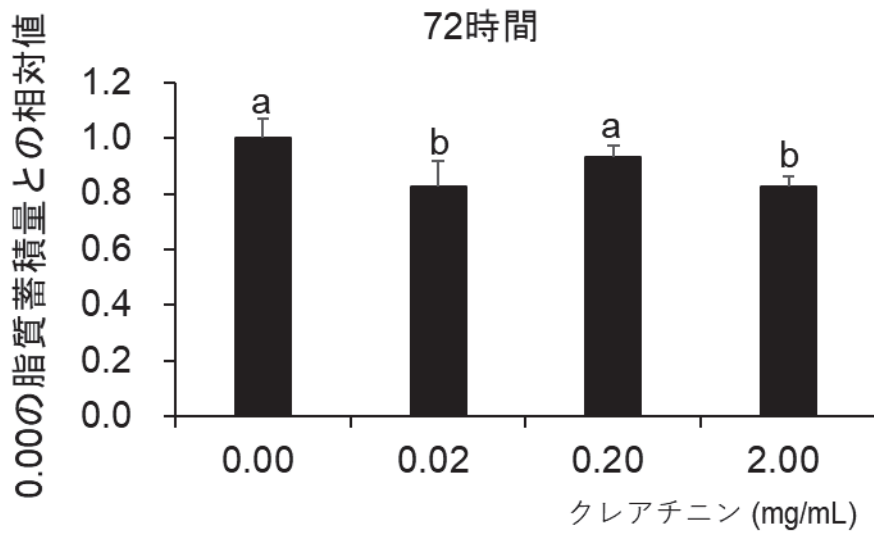


図 8 ヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解に対するクレアチニンの作用 (続き)

(C) クレアチニン処理 72 時間後のオイルレッド染色抽出液に対する、分光光度計を用いた脂質量測定

グラフ中の数字はクレアチニン処理時間と各クレアチニン濃度を表す。

a, b はグループ内の各点 ( $P < 0.05$ ) の有意差を表す。

### 4.3.3 ヒツジ成熟培養脂肪細胞の mRNA 発現に対するクレアチニンの作用

#### 24 時間でのクレアチニンの作用

クレアチニン処理後 24 時間でのヒツジ成熟培養脂肪細胞での PPAR- $\gamma$  2 の遺伝子の発現は、クレアチニン濃度依存的にわずかに増加する傾向にあった (図 9 (A))。PPAR- $\gamma$  2 遺伝子の発現はクレアチニン高濃度処理区 (2.00 mg/mL) のサンプルで有意な増加を示したが、統計分析では濃度依存的な増加は明確にならなかった (図 9 (A))。

クレアチニン処理サンプル (0.02 および 2.00 mg/mL) での TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現は増加したが、低濃度 (0.02 mg/mL) 処理サンプルでは遺伝子発現が変化しなかった (図 9 (B))。統計分析では無処理サンプルとクレアチニン処理サンプルとの間に差異は現れなかった (図 9 (B))。

ケメリンの遺伝子の発現は、無処理サンプルとクレアチニン処理サンプルとの間は統計分析では差異を示さなかった (図 9 (C))。したがって、クレアチニン処理を行ってもケメリンの遺伝子の発現は変化しなかった。

ケμεριν受容体の遺伝子の発現は、無処理サンプルとクレアチニン高濃度処理サンプル (0.20 および 2.00 mg/mL) との間で差異はなく、統計分析によっても差異が示されなかった (図 9 (D))。有意差は無処理サンプルとクレアチニン低濃度 (0.02 mg/mL) 処理サンプルとの間で検出された (図 9 (D))。

#### 72 時間でのクレアチニンの作用

クレアチニン処理後 72 時間のヒツジ成熟培養脂肪細胞での PPAR- $\gamma$  2

の遺伝子の発現は、無処理サンプルとクレアチニン高濃度処理サンプル (2.00 mg/mL) のレベルを比較すると差が見られ、クレアチニン高濃度処理サンプルで発現が増加していた (図 10 (A))。

高濃度 (2.00 mg/mL) クレアチニン処理サンプルでの TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現は無処理サンプルと比較して有意に増加した (図 10 (B))。しかし、無処理サンプルと低濃度 (0.02 mg/mL) および中濃度 (0.20 mg/mL) のクレアチニン処理サンプルの間に統計分析では差が見られなかった (図 10 (B))。

無処理区とクレアチニン処理サンプルでのケメリンの遺伝子の発現は、いずれも統計的な差を示さなかった (図 10 (C))。したがって、クレアチニン処理によってケメリンの遺伝子の発現は変化しなかった。

ケμεριν受容体の遺伝子の発現は、クレアチニン処理サンプルでは濃度依存的に増加する傾向を見せたが、統計分析により濃度依存性は示されなかった (図 10 (D))。無処理サンプルとクレアチニン低濃度処理サンプル (0.02 mg/mL) との間には有意差が検出された。

### ヒツジ成熟培養脂肪細胞での mRNA 発現の 24 時間と 72 時間におけるクレアチニンの作用の差異

クレアチニン処理後 24 時間および 72 時間で、ヒツジ成熟培養脂肪細胞での PPAR- $\gamma$  2 の遺伝子の発現は処理時間に関係なく同様のパターンを示した (図 9 (A) および 10 (A))。クレアチニン処理サンプルの TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現は、無処理サンプルのものと比較して、クレアチニン処理後 24 時間のサンプルおよび 72 時間のサンプルで増加する傾向を見せた (図 9 (B) および 10 (B))。クレアチニン処理後 72 時間でのクレアチ



ニンの作用は濃度依存的に増加する傾向を見せた (図 10 (B))。しかし、クレアチニン処理後 24 時間でのクレアチニンの作用は、いずれの濃度のクレアチニン処理サンプル間でも差を示さなかった。

ケメリンの遺伝子の発現量は、無処理サンプルと各濃度のクレアチニン処理サンプルを比較するとクレアチニン処理後 24 時間よりも 72 時間でクレアチニン処理によって増加する傾向を示した (図 9 (C) および 10 (C))。しかし、無処理サンプルと各濃度クレアチニン処理サンプルのいずれにおいてもケメリンの遺伝子の発現はクレアチニン処理後 24 時間でも 72 時間でも各グループにおいて同じレベルであり、差が見られなかった (図 9 (C) および 10 (C))。

ケメリン受容体の遺伝子の発現はクレアチニン処理後 24 時間で無処理サンプルとクレアチニン処理サンプルを比較すると、低濃度クレアチニン処理サンプル (0.02mg/mL) で低下したが、クレアチニン処理サンプル同士での違いは明確ではなかった (図 9 (D))。クレアチニン処理後 72 時間のサンプルでは、ケメリン受容体の遺伝子の発現は、無処理サンプルと高濃度クレアチニン処理サンプル (2.00mg/mL) との間で有意な差を示した (図 10 (D))。

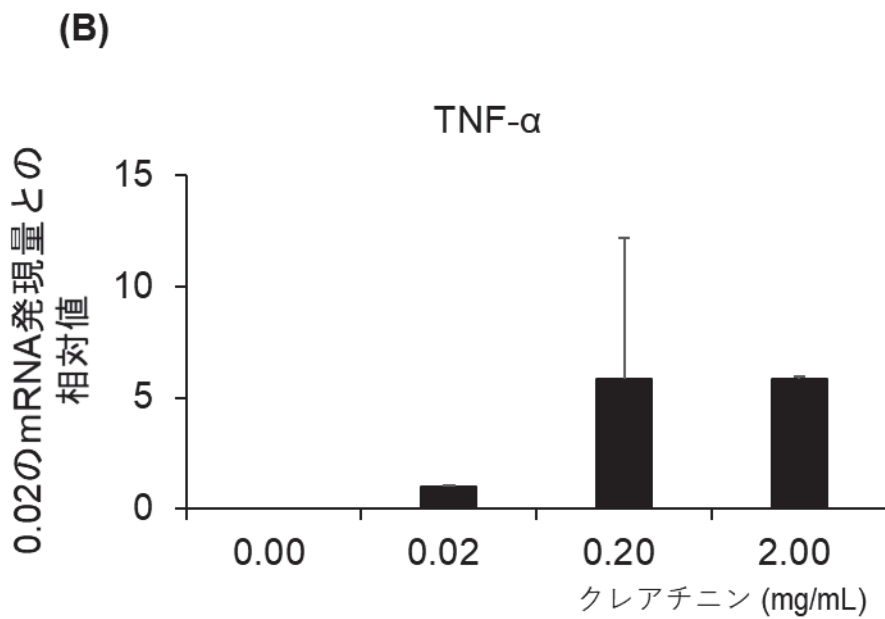
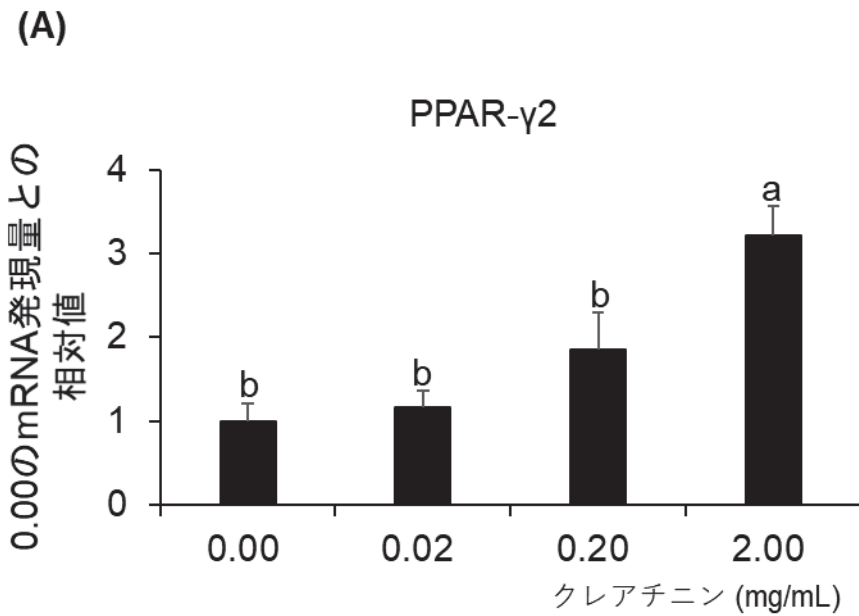


図 9 クレアチニン処理後 24 時間のヒツジ成熟培養脂肪細胞の遺伝子発現

(A) PPAR- $\gamma$  2

(B) TNF- $\alpha$

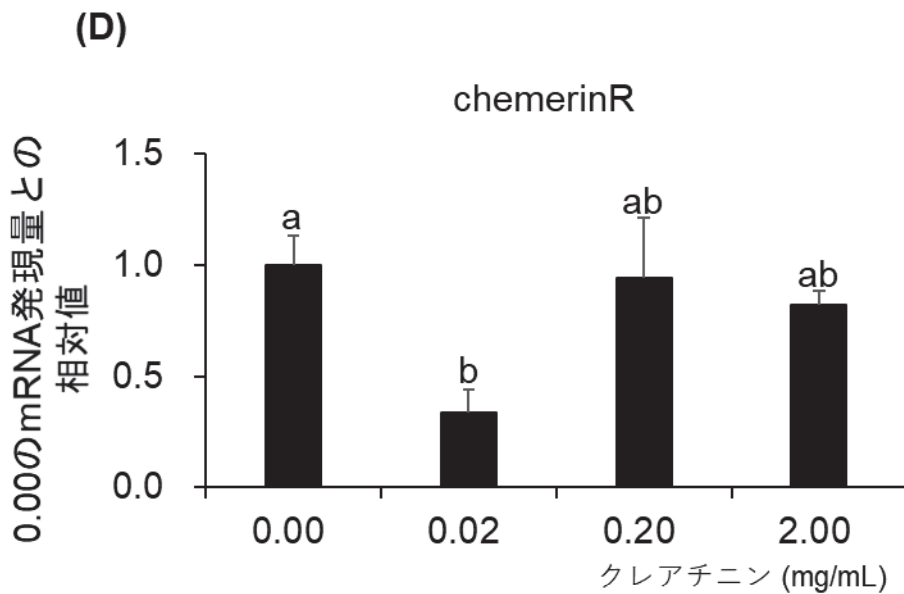
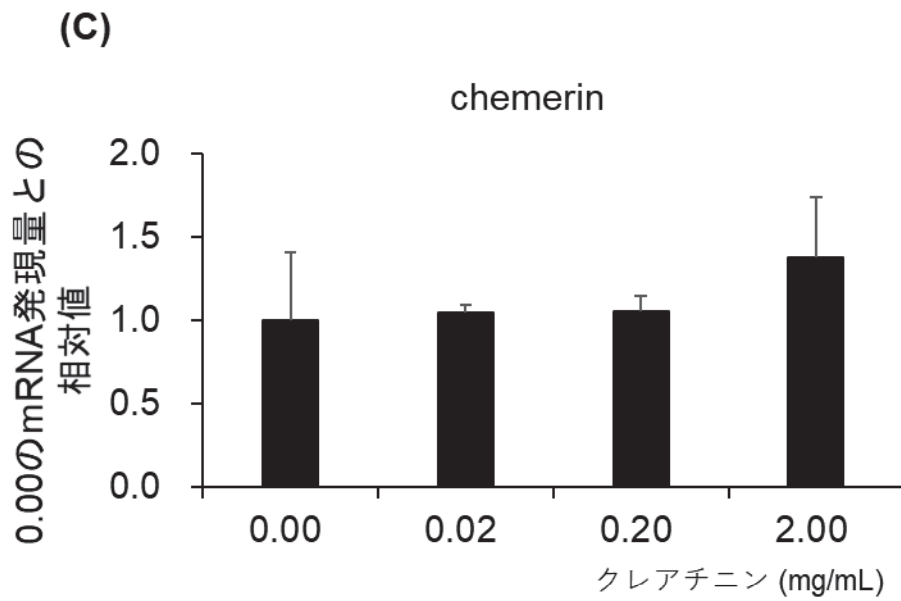


図 9 クレアチニン処理後 24 時間のヒツジ成熟培養脂肪細胞の遺伝子発現 (続き)

(C) ケメリン

(D) ケメリン受容体

a, b はグループ内の各点 ( $P < 0.05$ ) の有意差を表す。

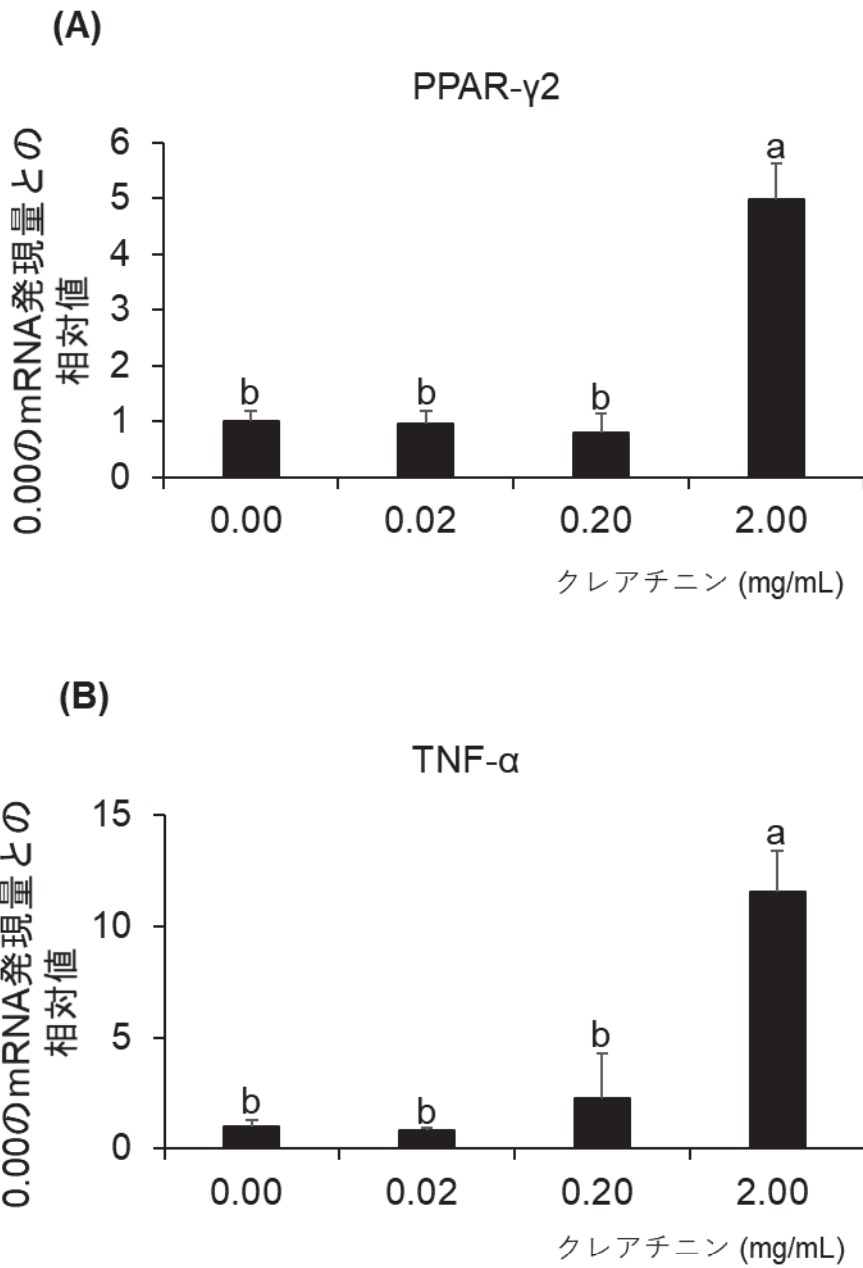


図 10 クレアチニン処理後 72 時間のヒツジ成熟培養脂肪細胞の遺伝子発現

(A) PPAR- $\gamma$  2

(B) TNF- $\alpha$

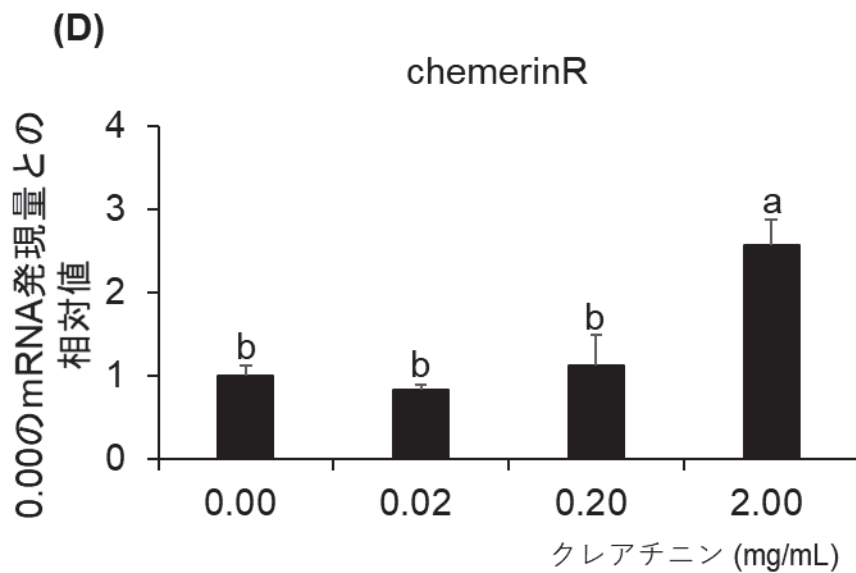
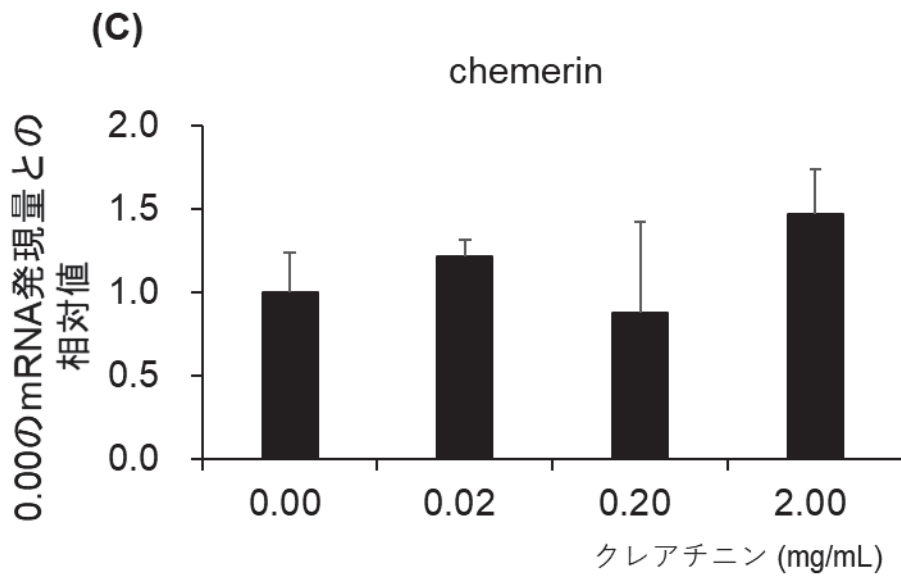


図 10 クレアチニン処理後 72 時間のヒツジ成熟培養脂肪細胞の遺伝子発現 (続き)

(C) ケメリン

(D) ケメリン受容体

a, b はグループ内の各点 ( $P < 0.05$ ) の有意差を表す。

#### 4.3.4 考察

##### ヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化

ヒツジ培養前駆脂肪細胞は分化期間で正常に発達し、細胞質中に脂肪滴を徐々に蓄積した。培養後 18 日目に多数の細胞で脂肪滴の蓄積が確認された。分化過程は分光光度計を用いたオイルレッド染色による抽出液の染色レベルを測定することによって確認した。上記のように、培養したヒツジ前駆脂肪細胞は培養後 18 日時点で成熟したと判断できる。したがって、本研究では、成熟したヒツジ脂肪細胞としてこれらの細胞を使用することは合理的であると考えられた。

##### ヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解に対するクレアチニンの作用

オイルレッド染色では、ヒツジ成熟培養脂肪細胞をクレアチニンで処理すると、クレアチニン処理後 24 時間および 72 時間で脂質蓄積量が濃度依存的にわずかに減少した。また、この減少は分光光度計を用いた抽出液の染色レベルの測定によっても示されたが、それらの間の差異は統計分析によって検出できなかった。しかしながら、クレアチニンは処理期間およびクレアチニン濃度に対応してヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質蓄積を阻害するか、またはヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質分解を促進する効果を誘導する可能性が考えられる。さらに、クレアチニンは脂質分解に関与するケメリンおよび TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現を制御することが示唆された。

ヒツジ成熟培養脂肪細胞での TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現はクレアチニン処理後 72 時間のサンプルで増加した。これは、クレアチニンが処理後 72 時間で TNF- $\alpha$  の分泌を誘発し、TNF- $\alpha$  が脂質分解を促進することを示唆

した。さらに、ヒツジ成熟培養脂肪細胞内の脂肪滴は、顕微鏡観察で示されたように減少した。

ヒツジ成熟培養脂肪細胞でのクレアチニン処理後 24 時間でのケメリン受容体の遺伝子の発現は、無処理サンプルと高濃度処理サンプル (2.0 mg/mL) との間で差異を示さなかった。しかし、高濃度クレアチニン処理サンプルのケメリン受容体の遺伝子の発現は、クレアチニン処理後 72 時間で高いレベルを示した。ケメリン受容体の遺伝子の発現のパターンから、高濃度のクレアチニン処理によって 72 時間後に脂肪細胞で多くのケメリン受容体の遺伝子が発現した。この遺伝子の発現を介して、脂肪分解を促進するケメリンの影響を制御することにより、クレアチニンが間接的に細胞内脂肪の分解に影響を与えることが考えられた。

遺伝子分析から、高濃度クレアチニン処理によって遺伝子の発現が増加し、結果的に増加した TNF- $\alpha$  およびケメリン受容体によりクレアチニン処理後 72 時間での脂質分解が促進される可能性を示した。クレアチニンが処理後 72 時間において高濃度で効果を示した理由は、ヒツジ成熟培養脂肪細胞のクレアチニンに対する感受性が低いことが原因であると考えられた。しかしながら、ヒツジ成熟培養脂肪細胞ではクレアチニン処理を長期間・高濃度で行うことにより、脂質分解を促進させる可能性があると思われた。

これらの結果から、クレアチニンは、ヒツジ成熟培養脂肪細胞における脂質分解を、TNF- $\alpha$ 、ケメリン受容体などの炎症性物質とその受容体の遺伝子の発現を制御することによって間接的に脂質分解を制御することを示唆した。

#### 4.4 小括

顕微鏡下での観察によりクレアチニン処理後 24 時間と 72 時間の細胞内の脂肪滴はともにクレアチニン濃度依存的に減少する傾向が認められた。したがって、クレアチニン処理がヒツジ培養成熟脂肪細胞の脂質分解を促進することが示された。

その後、クレアチニン処理サンプルの PPAR- $\gamma$  2、TNF- $\alpha$ 、ケメリンとケメリン受容体の遺伝子の発現を分析した。PPAR- $\gamma$  2 の遺伝子の発現は、クレアチニン処理後 24 時間と 72 時間とで類似したパターンを示し、クレアチニン処理による PPAR- $\gamma$  2 の遺伝子の発現の経時的な変化は認められなかった。また、TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現は、クレアチニン処理後 72 時間の高濃度 (2.00 mg/mL) クレアチニン処理区で増加した。したがって、クレアチニン処理は脂質分解に関与する TNF- $\alpha$  の発現の増加を誘導することが示された。

さらに、ケメリン遺伝子の発現はクレアチニン処理により影響を受けなかった。一方、ケメリン受容体遺伝子の発現は 24 時間の低濃度処理区で低下したが、クレアチニン処理後 72 時間の高濃度処理区で有意な増加が見られた。したがって、ケメリン遺伝子の発現はクレアチニン処理によって変化しなかったが、ケメリン受容体の遺伝子はクレアチニン処理によって濃度依存的・経時的に発現が変化することが示唆された。

これらの結果から、クレアチニンがケメリンの感受性を制御することで、ヒツジ成熟脂肪細胞における脂質分解作用を間接的に制御している可能性が示された。したがって、ケメリンはヒツジ成熟脂肪細胞において脂質分解に関与する新たな因子であることが示唆された。



## 第 5 章 ウシ乳腺上皮細胞の乳汁分泌機構に及ぼすケメリ ン受容体の遺伝子発現に対するクレアチニンの作用

### 5.1 緒言

クレアチニンは第 4 章の緒言で述べたように、その生理的な機能に関してはあまり知られておらず、多くの不明点が存在している。しかし、第 4 章で述べたように、クレアチニンはヒツジ培養脂肪細胞に対して細胞内脂質の分解を促進する因子であることが示唆された。本章で行う実験 4 では、泌乳に関与するウシ培養乳腺上皮細胞を材料としてクレアチニンの作用について検討を行った。

泌乳初期の乳牛は栄養素摂取量が要求量を下回る場合、乳汁分泌に必要な養分を充足させるために体組織の動員が行われ、筋組織の分解に起因すると考えられる血中クレアチニン濃度の増加が報告されている (Piccione ら 2012)。クレアチニンも炎症性物質と同様に乳腺上皮細胞に作用し、クレアチニン濃度の増加が乳汁分泌に影響を与える可能性がある。

細胞に他の組織からの物質が作用する一例として、脂肪組織において、脂肪細胞から分泌される炎症性物質ケメリンは脂肪細胞の遊離脂肪酸の放出を促進し、脂肪滴の脂質分解を加速させるという報告がある (Suzuki ら 2012, Fu ら 2016)。また、ケメリンは脂肪細胞と同様に乳腺および他の組織に影響を及ぼし、脂質代謝に関する遺伝子の発現を制御するという報告がある (Song ら 2010, Yang ら 2012, Li ら 2015, Suzuki ら 2015)。このように、乳腺での乳汁分泌は乳腺と他の組織の相互作用によ

り制御されており、乳腺以外の組織から放出される物質が乳汁分泌に影響を及ぼす可能性がある。本章で行う実験 4 では乳汁分泌に関連する TG の分泌、 $\kappa$ -カゼインおよびケメリン遺伝子の発現に関して、ウシ培養乳腺上皮細胞にクレアチニンが及ぼす作用に着目した。泌乳期の血中クレアチニン濃度の増加に関する過去の報告 (Piccione ら 2012) を参考に、泌乳期と泌乳していない期間を想定してウシ培養乳腺上皮細胞のモデルである MAC-T 細胞へのプロラクチン添加と異なる濃度のクレアチニン処理を行った。乳腺の乳汁分泌に及ぼすケメリン受容体の遺伝子発現ならびに物質の代謝へのクレアチニンの影響を検討するため、乳腺上皮細胞の利用する栄養素のほか、乳腺上皮細胞の分泌物と考えられる培地中の総タンパク質、グルコース、TG、NEFA の増減を測定した。

## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 細胞培養

東北大学農学研究科の盧尚建准教授から提供された MAC-T 細胞を 12well 細胞培養プレートに播種して、細胞増殖培地 (DMEM High-Glucose (和光純薬株式会社), Fetal Bovine Serum (Life Technologies Corporation) 10%, Antibiotics mixture (和光純薬株式会社) 1%,) により培養した。培養条件は CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定した。

細胞面積がコンフルエントとなった状態でサンプルをプロラクチン 5  $\mu$ g/mL 無添加区と添加区の 2 つのグループに分け、それぞれクレアチニン濃度を 0.0, 0.2, 2.0 mg/mL に調整した培地で処理し、処理後 4 日目で

培地の回収および RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社) による RNA の抽出を行った。クレアチニン処理区においては、クレアチニン 濃度 0.2mg/mL 処理区を低濃度区、2.0 mg/mL 処理区を高濃度区とした。本章で行う実験 4 でのクレアチニンの処理濃度は過去の報告 (Doornenbal ら 1988, Otto ら 2000, Accorsi ら 2005, Col ら 2007, Piccione ら 2009, Piccione ら 2012) で計測された反芻家畜ウシの血中クレアチニン濃度を参考に設定した。また、過去の報告 (Yamaji ら 2007) を参考にして乳腺上皮細胞に作用するプロラクチンの濃度を 5  $\mu$ g/mL と設定した。

### 5.2.2 培地分析

実験中の各々のサンプル (プロラクチンの無添加・添加、クレアチニン無処理・各濃度処理区) の培地をクレアチニン処理後 4 日目に回収し、培地中の各物質の分析を行った。分析した物質はグルコース、NEFA (遊離脂肪酸)、TG (中性脂肪) および総タンパクで、各物質に対するラボアッセイキット (和光純薬株式会社) を用いて培地に含まれる各物質の濃度を計測した。

### 5.2.3 遺伝子分析

Total RNA は実験中の各々のサンプル (プロラクチンの無添加・添加、クレアチニン無処理・各濃度処理区) のクレアチニン処理後 4 日目の細胞から RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社) を用いて抽出し、PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて total RNA を逆転写し cDNA を合成した。SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II キット (タカラバイオ株式会社) を用いた RT-PCR 法により、乳汁分泌に関連する  $\kappa$ -カゼイン

ンの遺伝子および炎症性物質に関連するケメリン受容体の遺伝子発現をリアルタイム PCR 装置 Takara Thermal Cycler Dice TP8000 (タカラバイオ株式会社) を用いて分析した。遺伝子発現量の調査項目およびプライマーは表 4 に示す。

表 4 遺伝子分析で用いたプライマー

gene	primer	sequence	product size (bp)
<i>κ</i> -casein	forward	5' -ccaggagcaaaaccaagaac-3'	129
	reverse	5' -tgcaactggtttctgttggt-3'	
chemerinR	forward	5' -tgcataaaccattctgta-3'	113
	reverse	5' -taggaggaatggcctgtgtc-3'	
GAPDH	forward	5' -gggtatcatatatgcacct-3'	215
	reverse	5' -atccacagtcttctgggtgg-3'	

## 5.2.4 統計解析

すべての統計解析にエクセル統計 (BellCurve for Excel) を用いた。遺伝子分析、培地分析において各群間に対する一元分散分析を行い、一元分散分析での差の検定は Tukey-Kramer の多重比較法により行った。有意水準は  $P < 0.05$  とし、また、 $0.05 < P < 0.1$  を傾向ありとした。

さらに、クレアチニン濃度を主効果とし、プロラクチンの無添加・添加による交互作用と単純主効果の検定を二元配置分散分析の Tukey の多重比較法により行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 5.3 結果および考察

### 5.3.1 遺伝子分析

クレアチニン処理後 4 日での  $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現は、プロラクチン無添加区ではクレアチニン無処理区と比較してクレアチニン高濃度区で有意な差が見られ、クレアチニン処理によって  $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現が増加した。プロラクチン添加区ではクレアチニン無処理区とクレアチニン低濃度区の間で有意な差は見られなかったが、クレアチニン低濃度区と高濃度区では有意な差が見られ、高濃度のクレアチニン処理によって  $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現が増加していた (図 11 (A))。交互作用の検定では高濃度処理区で交互作用が検出され、 $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現の増加がプロラクチンの添加による相乗効果によって増強されることが示された。

ケメリン受容体の遺伝子の発現はクレアチニン処理後 4 日で、プロラクチン無添加区ではクレアチニン処理によりクレアチニン無処理区と比較

して、クレアチニン低濃度区および高濃度区で有意な差が見られ、ケメリン受容体の遺伝子の発現が低下した。プロラクチン添加区ではクレアチニン無処理区と処理区の間で顕著な差は見られなかったが、クレアチニン無処理区でプロラクチン無添加区と比較して低い値を示していた。(図 11 (B))。交互作用の検定ではすべての区でクレアチニン濃度とプロラクチンの無添加・添加で交互作用が検出され、クレアチニン処理によるケメリン受容体遺伝子の発現の低下にプロラクチンの添加による相殺効果が示された。

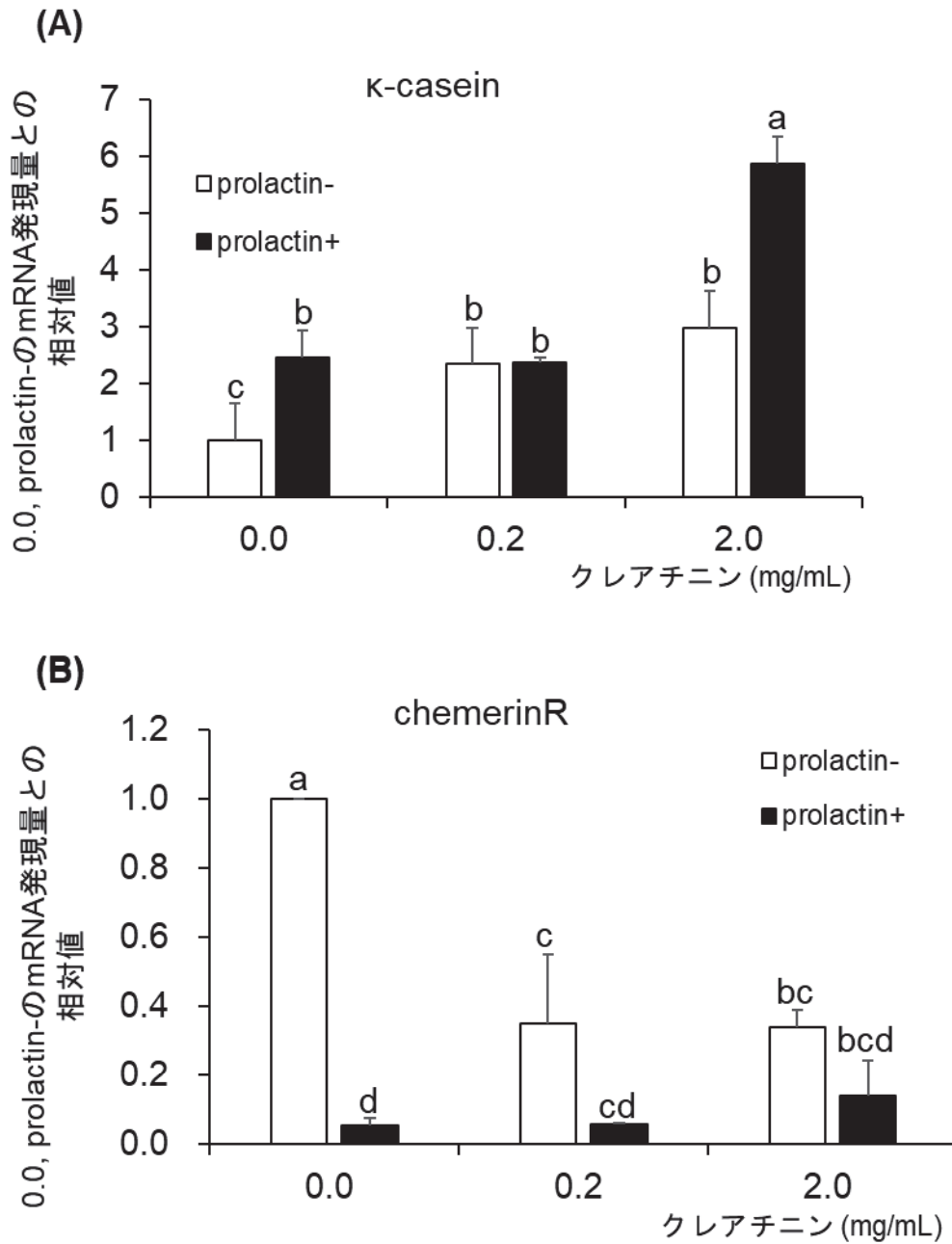


図 11 クレアチン処理後 4 日目における MAC-T 細胞の遺伝子発現  
 (A) クレアチン処理後 4 日目における κ-カゼイン遺伝子発現量  
 (B) クレアチン処理後 4 日目におけるケメリン受容体遺伝子発現  
 遺伝子分析はプロラクチン添加区と無添加区における各グループに対してそれぞれ解析を行った。  
 a, b, c, d はそれぞれ有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

遺伝子分析の結果、MAC-T 細胞での  $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現はプロラクチンの無添加・添加に関わらずクレアチニン処理により増加した。この結果はクレアチニン処理により MAC-T 細胞は  $\kappa$ -カゼインの分泌を加速させたと考えられる。 $\kappa$ -カゼインは Hallen ら (2008) が報告している様に、乳タンパクとして重要な乳成分である。MAC-T 細胞での  $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現がプロラクチンの無添加・添加に関わらず、クレアチニン処理の結果、同様に  $\kappa$ -カゼインの遺伝子発現が増加した。これは、プロラクチンの無添加・添加にかかわらず、クレアチニン処理に対する MAC-T 細胞の感受性が変化しないことが示唆された。

クレアチニン処理後 4 日目での MAC-T 細胞でのケメリン受容体の遺伝子の発現はプロラクチン無添加区でのクレアチニン処理では無処理区と比較して減少した。ケメリン受容体の遺伝子の発現が減少したこの結果から、クレアチニンがケメリン受容体の遺伝子の発現を介して MAC-T 細胞の機能に対するケメリンの影響を抑制することが示された。また、脂肪細胞・筋細胞に対するケメリンの作用は、栄養素取り込みおよびエネルギーの消費に影響を及ぼすことが報告されている (Li ら 2015, Fu ら 2016)。MAC-T 細胞でクレアチニン処理によってケメリン受容体の遺伝子の発現が低下することは、MAC-T 細胞はこの報告にあるようなケメリンの影響を受けにくくなったと考えられる。したがって、クレアチニンはケメリン受容体の発現の抑制を通して間接的にケメリンに対する感受性を抑制し、MAC-T 細胞の脂質代謝に影響を与えることが示唆された。



### 5.3.2 培地分析

#### グルコース

クレアチニン処理後 4 日の培地中グルコース量は、プロラクチン無添加区ではクレアチニン無処理区とクレアチニン高濃度処理区の間で低下傾向を示し、クレアチニン処理によって培地中のグルコース量が濃度依存的に低下する傾向にあった。プロラクチン無添加区と添加区ではクレアチニン無処理区とクレアチニン低濃度処理区の間には有意な差は見られなかったが、無処理区とクレアチニン高濃度処理区の間でクレアチニン処理によって培地中のグルコース量が低下する傾向にあった (図 12)。交互作用の検定では交互作用が検出されなかった。

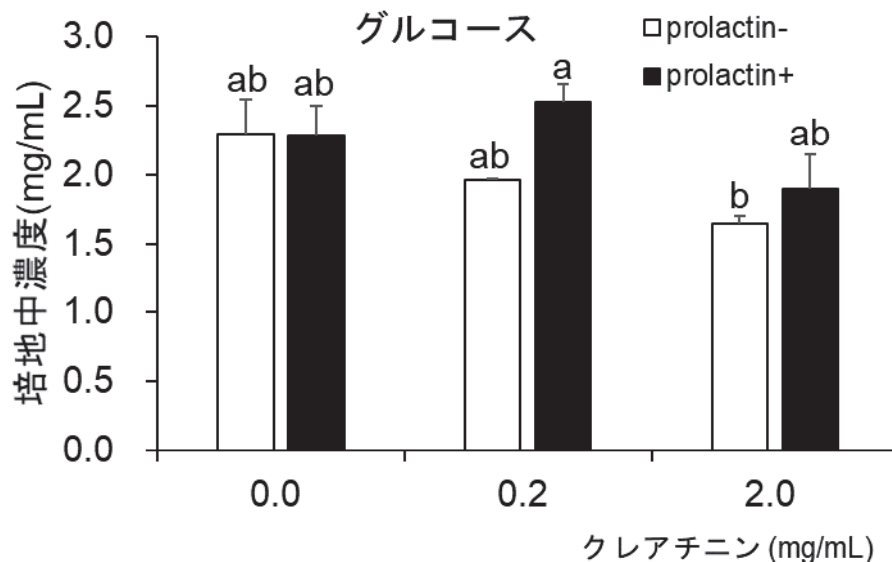


図 12 クレアチニン処理後 4 日目における MAC-T 細胞の培地中グルコース濃度の分析

濃度はプロラクチン添加区と無添加区における各グループに対してそれぞれ分析を行った。

a, b は有意差を示す ( $P < 0.01$ )。

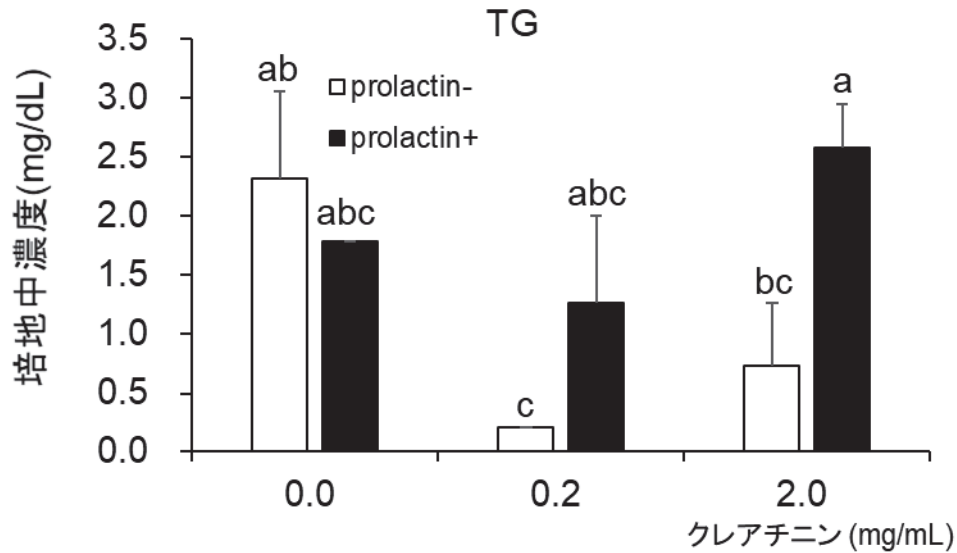
## TG

クレアチニン処理後 4 日の培地中中性脂肪濃度はプロラクチン無添加区ではクレアチニン無処理区とクレアチニン高濃度処理区で低下傾向を示し、クレアチニン処理によって培地中の TG 量が減少した。クレアチニン無処理区とクレアチニン低濃度処理区で有意差が見られ、クレアチニン処理によって培地中の TG 量が減少した。プロラクチン添加区ではクレアチニン無処理区と処理区の間で有意な差はみられなかった (図 13 (A))。クレアチニン高濃度処理区でクレアチニン濃度とプロラクチンの無添加・添加で交互作用が検出され、クレアチニン処理による TG 量の増加がプロラクチンの添加による相乗効果によって増強されることが示された。

## NEFA

クレアチニン処理後 4 日では培地中遊離脂肪酸濃度がプロラクチン無添加・添加下で、いずれもクレアチニン無処理区とクレアチニン低濃度処理区・高濃度処理区との間に有意差は見られなかった (図 13 (B))。交互作用の検定では交互作用が検出されなかった。

(A)



(B)

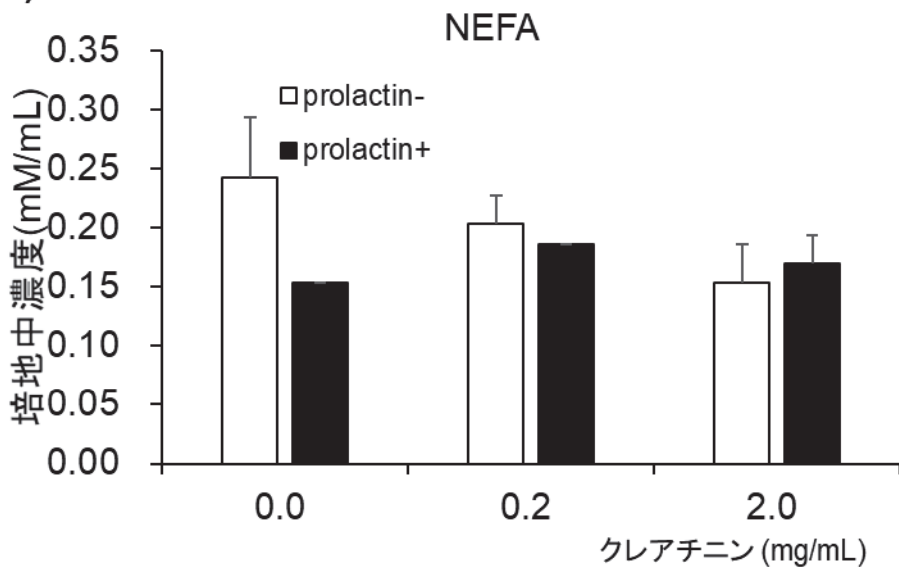


図 13 クレアチニン処理後 4 日目における MAC-T 細胞の培地の中性脂肪と NEFA 濃度の分析

(A) クレアチニン処理後 4 日目における中性脂肪 (TG) の量

(B) クレアチニン処理後 4 日目における遊離脂肪酸 (NEFA) の量

濃度はプロラクチン添加区と無添加区における各グループに対してそれぞれ分析を行った。

a, b, c は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

## 総タンパク

クレアチニン処理後 4 日の培地中総タンパク濃度はプロラクチン無添加区ではクレアチニン無処理区とクレアチニン低濃度処理区の間で有意な差はみられなかったが、無処理区とクレアチニン高濃度処理区の間で有意な差が見られ、クレアチニン処理によって培地中の総タンパク濃度が増加した。プロラクチン添加区ではクレアチニン無処理区と処理区の間で有意な差が見られ、クレアチニン処理によって培地中の総タンパク濃度が増加した (図 14)。交互作用の検定によれば、クレアチニン低濃度処理区で総タンパク量が増加するのはプロラクチンの添加による相乗効果であったことが示された。

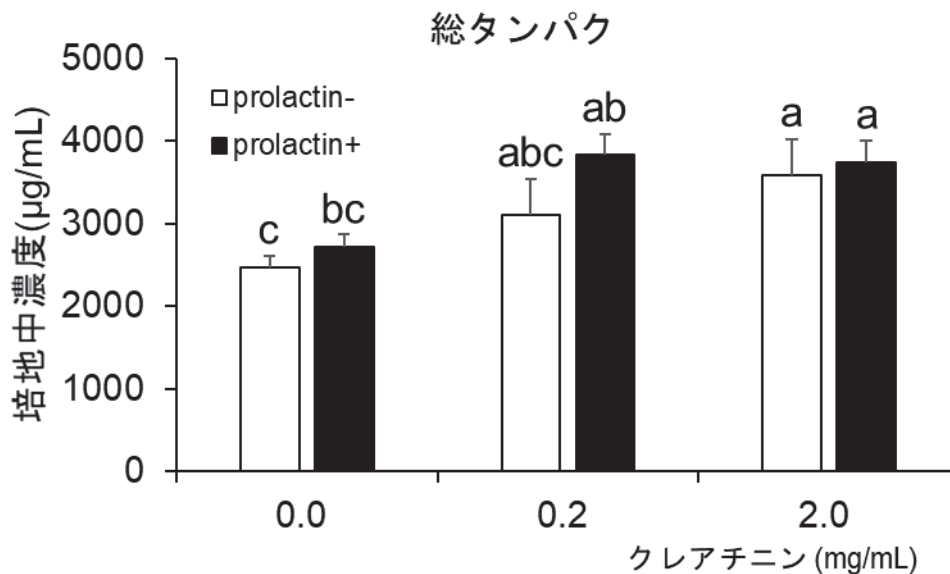


図 14 クレアチニン処理後 4 日目における MAC-T 細胞の培地中の総タンパク濃度の分析

濃度はプロラクチン添加区と無添加区における各グループに対して、それぞれ解析を行った。

a, b, c は有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

上述の結果は、以下の通りに要約することができる。

クレアチニン処理後 4 日の培地中のグルコース量は減少した (図 12) 。そして、総タンパク質の量はプロラクチンの無添加・添加にかかわらず、クレアチニン処理によって増加した (図 14) 。

NEFA と TG の量は、プロラクチンの無添加区でクレアチニン処理によって減少する傾向がみられたが、対照的に、これら 2 つの量はプロラクチン添加区で増減を示さなかった (図 13) 。

### 5.3.3 考察

培地分析の結果から、MAC-T 細胞ではプロラクチンの無添加・添加にかかわらず、クレアチニン処理により培地中のグルコースが低下する傾向を示した。また、プロラクチンの無添加・添加にかかわらず、クレアチニン処理により培地中の総タンパク質が増加した。これは MAC-T 細胞がクレアチニンの作用により培地中のグルコースの取り込みを促進し、乳タンパク質の分泌を促進したことにより、結果的に培地中の総タンパク質が増加した可能性を示している。乳タンパク質の増加が総タンパク質の増加に関連するという過去の報告 (Huynh ら 1991, Hallen ら 2008) から、MAC-T 細胞はクレアチニン処理によりグルコース取り込みを促進し、乳タンパク質を含む総タンパク質の分泌を増加させることが示唆された。

培地中の中性脂肪 (TG) 濃度は実験開始から 4 日目においてプロラクチン無添加区のクレアチニン処理区で減少した。Mcbride ら (1963) が正常に発達した乳腺上皮細胞でリパーゼの遺伝子が発現し、中性脂肪を取り込むことが可能であるという報告をしているが、この報告と同様の理由で MAC-T 細胞がクレアチニン処理により中性脂肪の取り込みを促進したと

考えられる。また、中性脂肪濃度はプロラクチン添加区のクレアチニン処理区において変化しなかった。これらの結果はクレアチニン処理によって中性脂肪の取り込みが促進されるが、乳腺上皮細胞が中性脂肪を分泌するという過去の報告 (Mida ら 2012) と合わせて、培地中の中性脂肪濃度はクレアチニンの作用によって減少する以上にプロラクチンの作用によって乳腺上皮細胞からの分泌が増加したためと考えられる。

乳牛のクレアチニンとプロラクチンの濃度は泌乳期に高いことが知られている (Beveris ら 1978, Piccione ら 2012) 。本章で行った実験 4 では、クレアチニンが泌乳期でプロラクチンと関連して乳腺上皮細胞の代謝に作用し、乳汁分泌を促進することを示唆した。そして、過去の報告ではケメリンが細胞の分化ならびに脂肪細胞・乳腺の脂質代謝に影響を与えることが示唆されており (Suzuki ら 2015, Fu ら 2016) 、ケメリンがどのような作用機序で乳汁分泌に関与するか、さらなる研究が必要となる可能性があった。本章で行った実験 4 ではクレアチニンとプロラクチンが乳牛の泌乳期においてケメリン受容体の遺伝子の発現を介し、ケメリンの影響を抑制することが強く示唆された。また、乳汁分泌を行う乳腺細胞の状態は血中クレアチニンおよび血中プロラクチン濃度に依存することも示唆された。これは、血中のクレアチニンとプロラクチン濃度が乳牛の泌乳期に高くなるという報告 (Accorsi ら 2005, Piccione ら 2012) と関連している可能性がある。

培地にクレアチニンを添加し MAC-T 細胞を培養することにより、プロラクチンの無添加・添加に関わらず乳汁分泌に関連する  $\kappa$ -カゼイン遺伝子の発現が増加した。また、ケメリン受容体の遺伝子の発現がクレアチニン処理により抑制された。このことから、クレアチニンは乳腺上皮細胞に

対してケメリン受容体の遺伝子発現を抑制してケメリンの影響を抑制し、結果的に乳腺上皮細胞の栄養取り込みを促進した。また、 $\kappa$ -カゼイン遺伝子の発現に影響を与えるとともに、乳汁分泌に影響を及ぼすことが示唆された。また、クレアチニンとプロラクチンは交互作用を示し、生体内でともに働く可能性が示唆された。

## 5.4 小括

筋代謝産物のクレアチニンがウシ培養乳腺上皮細胞に及ぼすケメリン受容体の遺伝子の発現に対する影響を検討するため、MAC-T 細胞をプロラクチン無添加・添加 (0 または  $5 \mu\text{g/mL}$ ) およびクレアチニン無処理、低濃度・高濃度 (0.2, 2.0 mg/mL) を処理した培地で 4 日間培養し、MAC-T 細胞のケメリン受容体と  $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現を分析した。また、培養後の培地中のグルコース、TG、NEFA および総タンパク質濃度の変化を計測した。ケメリン受容体の遺伝子の発現はプロラクチン無添加区でクレアチニン処理によって減少し、プロラクチン添加区では有意差が示されなかったが、プロラクチン無添加区と比較して低い値を示していた。この結果はプロラクチン無添加区でのクレアチニンが MAC-T 細胞においてケメリン受容体の発現を制御し、ケメリンが乳汁分泌機構に及ぼす影響を間接的に制御していることが示唆された。 $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現はプロラクチン無添加区の高濃度クレアチニン処理で増加した。また、培地中の TG 濃度はプロラクチン無添加区でクレアチニンの濃度依存的に減少する傾向を示したが、プロラクチン添加区では有意な差は見られなかった。一方、培地中の総タンパク質濃度はプロラクチン無添加・添加にかか

わらずクレアチニン高濃度処理により増加した。特にプロラクチン添加区でケメリン受容体の遺伝子の発現が大きく低下し、 $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現が大きく増加していることから、MAC-T 細胞においてケメリンの影響の抑制と  $\kappa$ -カゼインを含む乳タンパク質の分泌について関連が示唆された。また、ケメリンは細胞の栄養素の取り込みおよび脂質分解に関与していることから、培地中の TG の増減はクレアチニンの作用によるケメリンの受容体遺伝子の発現の抑制と関連があると考えられる。

これらの結果よりプロラクチンの無添加区・添加区で  $\kappa$ -カゼインとケメリン受容体の遺伝子の発現のほか、培地中 TG 量について乳腺上皮細胞の感受性が影響を受けることが示された。特にケメリン受容体の遺伝子発現はプロラクチン添加で大きく低下した。培養ウシ乳腺上皮細胞でのケメリン受容体遺伝子の発現が低下した結果と乳汁分泌の関連性は本章で行った実験 4 では明確な関連が見られなかったが、実験 4 での培地中の TG 量の変化と、ケメリンが脂質分解に関連することから、ケメリンが乳汁分泌機構に影響を及ぼす可能性が存在し、クレアチニンはケメリン受容体の遺伝子発現の制御を介してケメリンの影響を抑制することが示唆された。

本章で行った実験 4 では、MAC-T 細胞に対するクレアチニンと泌乳に関連するホルモンであるプロラクチンの添加によってケメリン受容体遺伝子の発現が大きく低下し、 $\kappa$ -カゼイン遺伝子の発現が大きく増加した。

この結果は泌乳期と泌乳していない期間でクレアチニンの乳腺上皮細胞に及ぼす影響が異なり、泌乳期での乳汁分泌が促進されることが示唆された。具体的には生体内でプロラクチンが増加する泌乳期の乳腺上皮細胞に対してクレアチニンがケメリンの影響を制御し、泌乳を間接的に制御するとともに、 $\kappa$ -カゼインを含む乳タンパク質の分泌が促進される可能性



が示唆された。

以上より、ケメリンは乳汁分泌機構と関連のある因子であることとともに、泌乳期と泌乳していない期間でクレアチニンおよびプロラクチンといった物質の影響によってケメリンの作用が調節されることが示唆された。泌乳期の乳腺上皮細胞の乳汁分泌に関する基礎的な知見の一部が得られたと判断できる。

## 第 6 章 総合結論

### 6.1 各実験の結論

実験 1 では、最初に脂肪細胞からケメリンが分泌されることを確かめるため、ヒツジ培養前駆脂肪細胞の分化過程におけるケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子の発現を検証した。また、脂肪細胞に及ぼすケメリンの影響について検討した。その結果、脂肪細胞分化誘導培地で処理したヒツジ前駆脂肪細胞におけるケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現量は、培養開始 12 日で脂肪細胞の分化マーカーである PPAR  $\gamma$ 、C/EBP  $\alpha$  および炎症性物質である TNF- $\alpha$  の遺伝子発現量と共に増加した。また、ヒツジ成熟脂肪細胞および前駆脂肪細胞におけるケメリン処理は、成熟脂肪細胞内の脂質減少と前駆脂肪細胞の分裂を促進することが示された。これらの結果より、ヒツジ培養脂肪細胞においてケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現動態は分化・成熟に伴って増加することが明らかとなった。また、ケメリンはヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質代謝および前駆脂肪細胞の増殖促進にも関与していることが示され、脂肪細胞の増殖と恒常性維持を通じて脂肪組織の発達に関与する因子であることが示唆された。

ケメリン処理がヒツジ脂肪細胞におけるケメリンの遺伝子発現およびケメリン受容体の遺伝子発現パターンに及ぼす影響がマウスやヒトの脂肪細胞に及ぼす影響と同様であったことから、反芻家畜の脂肪細胞におけるケメリン・ケメリン受容体の遺伝子発現とケメリンの作用は単胃動物と反芻動物で共通した部分を持つと考えられ、ケメリンの作用は反芻家畜に

普遍的であると考えられる。

実験 2 では脂肪酸処理によって脂肪細胞での脂質蓄積ならびに分化関連遺伝子およびケメリン遺伝子発現が変化するかについて検討を行った。長鎖脂肪酸・中鎖脂肪酸・短鎖脂肪酸を含む培地でヒツジ培養前駆脂肪細胞の培養を行い、オイルレッド染色と遺伝子分析を行った。その結果、ヒツジルーメン内微生物の発酵により生成される揮発性脂肪酸および様々な炭素鎖数を有する脂肪酸は、脂肪細胞の脂質蓄積および分化に対して直接的な影響を及ぼさず、エネルギー源として脂肪細胞に利用されることが示唆された。また、これらの脂肪酸の大部分がケメリンの遺伝子発現に影響を及ぼすことから、ケメリンは脂肪細胞の脂質蓄積および分化を介さずに脂肪酸処理によって分泌が促進されることが示唆された。さらに、ケメリンは脂肪細胞の分化を誘導する作用を持つことから、ケメリンはヒツジ体内に存在する脂肪酸によって前駆脂肪細胞の分化を促進し、脂肪組織の発達に関与する因子であることが示唆された。短鎖脂肪酸は反芻胃内発酵産物である。これらの短鎖脂肪酸が脂肪細胞において分化関連遺伝子 PPAR  $\gamma$ ・C/EBP  $\alpha$  やケメリンおよびケメリン受容体の発現に関する TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を増加させる。このことから、短鎖脂肪酸は脂肪細胞の増殖と分化を促進させると考えられる。したがって、飼料の摂取による短鎖脂肪酸の供給のみでも生体内の脂肪組織の発達を促進させることが示唆された。

また、中鎖脂肪酸・長鎖脂肪酸は細胞内の脂肪酸合成作用によって生成される脂肪酸であることが知られている。特にパルミチン酸を含む長鎖脂肪酸は脂肪細胞の成熟に伴って脂肪滴に蓄積され、十分に成熟した脂肪細胞中で特異的に起こる脂質分解の結果によって放出されると考えられる。

これらの長鎖脂肪酸が分化過程にある脂肪細胞において脂質蓄積を促進させ、分化関連遺伝子・脂質蓄積関連遺伝子・ケメリンの遺伝子発現を増加させることが本研究で確認された。また、中鎖脂肪酸がケメリンの遺伝子発現を増加させることが本研究で確認された。したがって、中鎖脂肪酸・長鎖脂肪酸は脂肪細胞の分化と脂質蓄積、あるいは成熟脂肪細胞での脂質分解を促進させると考えられる。成熟した脂肪細胞においてケメリンの分泌および長鎖脂肪酸が放出されることは、成熟脂肪細胞では脂質分解により過度の肥大化を抑制するなど細胞の恒常性を維持し、周囲に存在する分化過程の脂肪細胞および脂質分解により未成熟の状態となった脂肪細胞の分化と脂質蓄積を促進する可能性が存在する。炭素鎖数が異なる脂肪酸は脂肪細胞の増殖・分化・脂質蓄積のいずれに関与するかがそれぞれ異なり、飼料摂取による栄養素の供給量の増加に伴って脂肪細胞の増殖と分化による発達が起きると考えられる。さらに、既に発達した脂肪組織において成熟細胞の脂質分解に伴う脂肪細胞の分化、脂質蓄積および脂質分解が起きると考えられ、脂肪酸によって脂肪組織の発達と恒常性の維持が行われていることが示唆された。

実験 3 において、筋組織から放出されるクレアチニンが培養脂肪細胞と乳腺細胞におけるケメリン・ケメリン受容体遺伝子の発現に及ぼす影響を研究した。成熟したヒツジ培養前駆脂肪細胞に異なる濃度のクレアチニンを作用させて脂肪滴のオイルレッド染色と比色分析による脂質量を比較した結果、24 時間と 72 時間の細胞内の脂肪滴はともにクレアチニン濃度依存的に減少する傾向が認められたため、クレアチニン処理がヒツジ培養成熟脂肪細胞の脂質分解を促進することが示された。また、遺伝子分析の結果、TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現量がクレアチニン処理後 72 時間の高濃度ク

レアチニン処理区で増加し、クレアチニン処理は脂質分解に関与する TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を誘導することが示された。ケメリン遺伝子の発現量はクレアチニン処理によって変化しなかったが、ケメリン受容体の遺伝子はクレアチニン処理によって濃度依存的・経時的に発現量が変化することが示唆された。これらの結果から、クレアチニンがケメリンの感受性を制御することによりヒツジ成熟脂肪細胞における脂質分解作用を間接的に制御している可能性が示唆された。したがって、ケメリンはヒツジ成熟脂肪細胞において脂質分解に関与する因子であることが考えられた。

実験 4 において、クレアチニンが乳腺上皮細胞の遺伝子発現と乳分泌機能に及ぼす影響を検討した。乳腺上皮細胞を培養した MAC-T 細胞に異なる濃度のクレアチニンと泌乳関連ホルモンプロラクチンを作用させて  $\kappa$ -カゼイン・ケメリン受容体の遺伝子の発現ならびに脂質代謝・乳分泌機構に対するクレアチニンの作用を調査した研究では、乳汁分泌に関連する脂質およびタンパク質の分泌、乳汁分泌ならびに炎症性物質ケメリン受容体の遺伝子の発現に対して、クレアチニンが及ぼす影響に着目した。ケメリン受容体の遺伝子の発現はプロラクチン無添加区でクレアチニン処理によって減少し、プロラクチン添加区では有意差が示されなかったがプロラクチン無添加区と比較して低い値を示していた。この結果はプロラクチン無添加区でのクレアチニンが MAC-T 細胞においてケメリン受容体の発現を制御し、ケメリンが乳汁分泌機構に及ぼす影響を間接的に制御していることが示唆された。 $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現はプロラクチン無添加区の高濃度クレアチニン処理で増加し、培地中の TG 濃度はプロラクチン無添加区でクレアチニンの濃度依存的に減少する傾向を示したが、プロラクチン添加区では有意な差は見られなかった。一方、培地中の総タンパク質

濃度はプロラクチン無添加・添加にかかわらずクレアチニン高濃度処理により増加した。この結果から、特にプロラクチン添加区でケメリン受容体の遺伝子の発現が抑制され、 $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現が増加したことから、MAC-T 細胞においてクレアチニンの作用によるケメリンの影響の抑制と $\kappa$ -カゼインを含む乳タンパク質の分泌との関連が示唆された。また、ケメリンは細胞の栄養素の取り込みのほか、脂質代謝に関与していることから、培地中の TG の増減はクレアチニンおよびプロラクチンの作用によってケメリン受容体の遺伝子の発現が抑制されたことと関連があると考えられる。これらの結果より、生体内での泌乳期と泌乳していない期間を想定して条件を設定したプロラクチンの無添加・添加でケメリン受容体・ $\kappa$ -カゼインの遺伝子発現ならびに培地中 TG 量・総タンパク量などの、乳腺上皮細胞でのケメリンへの感受性と乳汁分泌機構に関する感受性が影響を受けることが示された。特にケメリン受容体の遺伝子発現はプロラクチン添加で大きく低下した。培養ウシ乳腺上皮細胞でのケメリン受容体遺伝子の発現が低下した結果と乳汁分泌の関連性は明確にはならなかったが、培地中の TG 量の変化と、ケメリンが脂質分解に関連する事実から、ケメリンが乳汁分泌機構に影響を及ぼす可能性が存在するとともにクレアチニンはケメリン受容体の遺伝子発現を抑制することにより、間接的にケメリンの影響を抑制することが示唆された。また、この結果は泌乳期と泌乳していない期間でクレアチニンの乳腺上皮細胞に及ぼす影響が異なり、泌乳期での乳汁分泌が促進されることが示唆された。具体的には生体内でプロラクチンが増加する泌乳期の乳腺上皮細胞に対してクレアチニンがケメリンの影響を制御し、泌乳を間接的に制御するとともに、 $\kappa$ -カゼインを含む乳タンパク質の分泌が促進される可能性が示唆された。

以上より、ケメリンは乳汁分泌機構と関連のある因子であることが示唆されるとともに、泌乳期と泌乳していない期間でクレアチニンおよびプロラクチンといった物質の影響によってケメリンの作用が調節されることが示唆された。泌乳期においては体組織の分解によるクレアチニン濃度の増加が起きると共に、泌乳関連ホルモンであるプロラクチンが増加する。プロラクチンとクレアチニンの作用によってケメリン受容体遺伝子発現の調節を介してケメリンの作用が制御されると共に脂肪細胞の脂質分解と乳腺上皮細胞の栄養素の取り込みと乳分泌が促進される結果が示された。これらの結果から、泌乳初期では筋細胞の異化によって筋細胞由来のアミノ酸とクレアチニンが血中に増加すると共にクレアチニンの増加により脂肪細胞も異化され、脂肪細胞の脂質分解によって脂肪酸が放出されることで乳腺上皮細胞にアミノ酸・脂肪酸などの栄養素が供給されると考えられる。一方で乳腺上皮細胞の代謝もクレアチニンの影響を受け、栄養素の取り込みと乳分泌が促進されると考えられる。これらの知見から、クレアチニンは脂肪細胞の脂質分解を促進して脂肪酸の放出を誘導し、クレアチニンの供給源である筋組織から放出されるアミノ酸と共に乳腺上皮細胞に栄養素を供給すると考えられる。また、クレアチニンは乳腺上皮細胞においてケメリン受容体の遺伝子発現を制御することでケメリンの作用を調節して細胞の代謝機能を制御し、栄養素の取り込みと乳分泌を促進する可能性が示唆された。

## 6.2 本論文の結論

反芻家畜の培養細胞を用いた実験でケメリン・ケメリン受容体が脂肪細胞の増殖、分化、脂質蓄積および脂質代謝に影響を及ぼす因子であるとともに、ケメリン・ケメリン受容体の遺伝子発現は生体内に存在する脂肪酸ならびにクレアチニンによる制御を受けることが示唆された。また、乳腺上皮細胞ではケメリン受容体の遺伝子発現がクレアチニンのみならず泌乳関連ホルモンであるプロラクチンにより制御され、乳腺上皮細胞のケメリンに対する感受性、遺伝子発現および脂質代謝を制御し、乳分泌に関連する脂質の代謝および分泌に影響を及ぼすことが示唆された。これらの結果より、反芻家畜の脂肪細胞・乳腺上皮細胞における増殖、脂質代謝および物質分泌に関する機能に対しケメリンがその調節に関与していることが明らかになった。実際に、ケメリンがヒツジ脂肪細胞の恒常性機能に関与する調節因子である可能性が示唆されるとともに、生体内に存在する物質である脂肪酸が前駆脂肪細胞の分化過程でケメリンの遺伝子の発現を調節した。また、クレアチニンが筋組織以外の脂肪細胞および乳腺上皮細胞の培養細胞に影響を及ぼし、ケメリンの作用機序を介して細胞の機能を制御していることが示唆された。

一連の実験により、ケメリンが家畜生産において脂肪細胞および乳腺上皮細胞の増殖、分化ならびに乳分泌機構の制御に関与する因子であることを示唆するものと考えられる。また、ケメリンが生体内でホメオスタシスおよびホメオレシスに関連するシグナルネットワークの存在を有することを示唆した。限られた部分ではあるが肉生産・乳生産において脂肪細胞および乳腺上皮細胞の増殖、分化、脂質代謝および乳生産の制御がケメリ



ンによって影響を受けることが示唆されたほか、ケメリンの遺伝子発現ならびにケメリンが脂肪細胞および乳腺上皮細胞の増殖、分化、脂質代謝および乳生産の制御に及ぼす影響が脂肪酸、クレアチニンならびにプロラクチンの無添加・添加によって調節される可能性が示唆されたことから、ケメリンは家畜生産において他の物質やホルモンとともに脂肪細胞の増殖、分化の制御ならびに乳腺上皮細胞の乳生産量の制御に関与する因子であることが示唆された。特に、脂肪細胞の成熟と脂質分解により合成・放出される長鎖脂肪酸によってケメリンの分泌が促進され、ケメリンが長鎖脂肪酸と共に脂肪細胞の分化・脂質蓄積に関与することが示された。脂肪細胞の成熟によって生成される脂肪酸が脂質蓄積の誘導、脂質蓄積関連遺伝子の発現の調節の他にケメリンの分泌を通じて前駆脂肪細胞の分化および脂質蓄積を促進し、脂肪組織の発達に寄与するため、長鎖脂肪酸は成熟脂肪細胞が多く含まれる発達した脂肪組織でその維持と発達に関与していると期待できる。また、長鎖脂肪酸とケメリンが脂肪組織に及ぼす効果として、成熟脂肪細胞から分泌されるケメリンによる脂質分解の促進と、成熟脂肪細胞の脂質分解に伴って放出される長鎖脂肪酸が脂質分解によって分化過程に戻った脂肪細胞に作用し、再び分化と脂質蓄積を促進する負のフィードバック機構への関与が示唆される。この機構により、発達した脂肪組織においてケメリンと長鎖脂肪酸は細胞の形態の恒常性維持、前駆脂肪細胞の分化と脂質蓄積に関与する可能性が存在する。また、脂肪酸の放出が他の組織への栄養素供給に関与する可能性が存在する。一方で、乳腺上皮細胞は泌乳初期と泌乳初期ではない妊娠期において体組織の動員による栄養素供給に関連する可能性が存在する。筋組織の動員によって血中に増加するクレアチニンがケメリンに対する感受性の調節を通じて

乳腺上皮細胞の遺伝子発現と物質分泌に関与し、タンパクの分泌による胎児の栄養素供給および初期泌乳に必要な栄養素の取り込み促進と乳タンパクの構成を変化させることが示唆される。また、泌乳初期という長い期間において、生体内でケメリンとクレアチニンが脂肪細胞と乳腺上皮細胞という乳生産に関与する複数の組織を構成する細胞に影響を及ぼすことおよび脂肪細胞と乳腺上皮細胞に対して遺伝子発現の変化や細胞のケメリンに対する感受性や物質の放出に関与する短期的な反応性が見られることから、ケメリン及びクレアチニンは泌乳に関して生体内のホメオレシスによる組織への栄養素供給と栄養素の分解に関与する因子である可能性が存在する。

肉生産や乳生産を制御する他の要因として考えられるアミノ酸等の栄養素、各種のホルモンおよびケメリン以外のアディポカイン等の研究も必要であると考えられる。また、今回の実験では培養細胞を用いたことにより、他の組織・細胞との関連は明確にはならなかったが、今後は他の組織・細胞との関連を明らかにする、さらなる発展した研究として生体を対象とした研究が必要であると考えられた。

## 謝辞

本研究では、鳥取大学大学院連合農学研究科 国際乾燥地科学専攻 国際乾燥地科学連合講座 一戸俊義教授ならびに宋相憲助教のご指導を賜りました。深甚の謝意を表します。

本研究を行うにあたって、島根大学大学院 生物資源科学研究科 松本卓也氏、島根大学 生物資源科学部 農林生産学科 農業生産学教育コース 戸澤碧氏を始めとした動物生産学分野研究室の学生諸氏よりご協力をいただきました。また、第 2 章の実験 1 および第 3 章の実験 2 の成果取りまとめにおいて、島根大学 生物資源科学部 農林生産学科 農業生産学教育コース 動物生産学分野研究室に所属していた就哲也氏、木下晋吾氏にご協力をいただきました。各位に感謝の意を表します。

## 摘要

ケメリンは主に肝臓組織および脂肪組織から分泌される炎症性物質で、ケメリン受容体を持つ細胞に影響を及ぼし、その細胞の脂質分解を促進するなど、物質分泌および生理作用に様々な影響を与えることが報告されている。ケメリンを介した種々の影響によって筋細胞、脂肪細胞および乳腺細胞が相互に影響し合う場合、食肉生産・乳生産において、ケメリンがこれらの細胞に及ぼす影響を把握することは重要である。なぜなら、ケメリンの影響によって食肉を構成する脂肪細胞の生理作用の変動が脂肪の発達に影響を与え、乳腺細胞の機能の変動が直接に乳生産量に関与していると考えられるからである。

**1.**脂肪細胞分化誘導培地でのヒツジ培養前駆脂肪細胞は培養開始後 12 日でケメリンおよびケメリン受容体遺伝子発現が増加した。また、脂肪細胞の分化マーカーの遺伝子発現も培養開始後 12 日で増加した。ケメリンおよびケメリン受容体遺伝子の発現はヒツジ培養脂肪細胞の分化の進行に伴って増加することが明らかとなった。さらに、ケメリン処理は成熟脂肪細胞内の脂質を減少させ、培養前駆脂肪細胞の分裂を促進させた。この実験により、ヒツジ培養脂肪細胞においてケメリンおよびケメリン受容体の遺伝子発現動態は分化・成熟に伴って増加することが明らかとなった。また、ケメリンはヒツジ成熟培養脂肪細胞の脂質代謝および前駆脂肪細胞の増殖の促進にも関与していることが示された。

**2.**ヒツジ培養前駆脂肪細胞を炭素鎖数の異なる 10 種類の脂肪酸を含む分化培地で培養を行ったところ、パルミチン酸処理区で脂質蓄積量が増加した。脂質合成関連因子の遺伝子発現が増加したが、脂肪細胞の分化関連

因子の遺伝子発現は増加しなかった。さらに、ケメリンの遺伝子発現はオレイン酸を除く 9 種類の脂肪酸処理で増加し、TNF- $\alpha$  の遺伝子発現は酢酸処理区で増加した。この実験で用いた大部分の脂肪酸がケメリンの遺伝子発現を促進することから、ケメリンは脂肪細胞の脂質蓄積および分化過程に関係なく、脂肪酸処理によって分泌が促進されることが示唆された。また、ケメリンは脂肪細胞の分化を誘導する作用を持つことから、ケメリンはヒツジ体内に存在する脂肪酸によって発現が促進される因子で、前駆脂肪細胞の分化を促進し、脂肪組織の発達に関与することが示唆された。

3. ヒツジ成熟脂肪細胞に対するクレアチニン処理によって細胞内の脂肪滴は濃度依存的に減少する傾向が認められた。次に、クレアチニン処理サンプルの PPAR- $\gamma$  2、TNF- $\alpha$ 、ケメリンとケメリン受容体の遺伝子の発現を分析した。クレアチニン処理による PPAR- $\gamma$  2 の遺伝子の発現の経時的な増減は認められなかった。また、脂質分解に関与する TNF- $\alpha$  の遺伝子の発現は、高濃度クレアチニン処理区で増加した。さらに、ケメリン遺伝子の発現はクレアチニン処理により影響を受けなかった。ケメリン受容体遺伝子の発現は 24 時間の低濃度処理区で低下したが、クレアチニン処理後 72 時間の高濃度処理区で有意な増加が見られた。ケメリン遺伝子の発現はクレアチニン処理によって変化しなかったが、ケメリン受容体の遺伝子はクレアチニン処理によって濃度依存的・経時的に発現が変化することが示唆された。これらの結果から、クレアチニンがヒツジ成熟脂肪細胞のケメリンに対する感受性を制御することで、脂質分解作用を間接的に制御している可能性が示唆された。

4. ウシ培養乳腺上皮細胞 (MAC-T 細胞) を泌乳期のホルモンの条件を再現したプロラクチン無添加・添加およびクレアチニン無添加、低濃度・高

濃度を処理した培地で培養し、ケメリン受容体と $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現を分析した。また、培養後の培地中のグルコース、TG、NEFA および総タンパク質濃度の変化を計測した。ケメリン受容体の遺伝子の発現はプロラクチン無添加区でクレアチニン処理によって減少した。この結果はプロラクチン無添加区でのクレアチニンがMAC-T細胞においてケメリン受容体の発現を制御し、ケメリンが乳汁分泌機構に及ぼす影響を間接的に制御していることが示唆された。 $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現はプロラクチン無添加区と添加区の両方で高濃度クレアチニン処理により増加した。また、培地中のTG濃度はプロラクチン無添加区でクレアチニン添加により減少する傾向を示した。培地中の総タンパク質濃度はプロラクチン無添加・添加にかかわらずクレアチニン高濃度処理により増加した。特にプロラクチン添加区でクレアチニン添加によりケメリン受容体の遺伝子の発現と $\kappa$ -カゼインの遺伝子の発現が最も大きく変動していることから、泌乳期でのクレアチニンはケメリンの影響の抑制と $\kappa$ -カゼインを含む乳タンパク質の分泌を促進することが示唆された。

本研究より、反芻家畜の脂肪細胞の発達および乳腺細胞の乳汁分泌機能はケメリン・ケメリン受容体遺伝子の発現がその調節に関与していることが示唆された。また、ケメリン・ケメリン受容体遺伝子の発現が脂肪酸、クレアチニンおよびプロラクチンによって調節される可能性が示唆されたことから、ケメリンが家畜生産において他の物質やホルモンとともに制御に関与する因子であることが示唆された。

## Summary

It has been reported that chemerin is an inflammatory substance mainly secreted from liver tissue and adipose tissue and has an influence on cells having chemerin receptor and promotes lipolysis of the cell and has various effects on substance secretion and physiological action. If myocytes, adipocytes and mammary gland cells interact with each other due to various effects via chemerin, it is important to grasp the influence of chemerin on these cells in the meat production and milk production. This is because the influence of chemerin affects the development of adipocytes constituting meat and the variation of the physiological action of adipocytes influences the development of adipocyte. And it is thought that the change in function of mammary gland cells is directly involved in milk production.

1. Sheep cultured preadipocytes in adipocyte differentiation induction medium increased chemerin and chemerin receptor gene expression 12 days after the start of culture. Gene expression of adipocyte differentiation marker also increased at 12 days after the start of culture. It was revealed that expression of chemerin and chemerin receptor genes increases with the progress of differentiation of sheep cultured adipocytes. In addition, chemerin treatment reduced lipids in mature adipocytes and promoted division of cultured preadipocytes. This experiment revealed that the gene

expression kinetics of chemerin and chemerin receptors in sheep cultured adipocytes increases with differentiation and maturation. In addition, it was shown that chemerin is also involved in suppression of enlargement of lipid droplets of sheep matured cultured adipocytes and promotion of precursor adipocyte proliferation.

2. Cultivation of sheep cultured preadipocytes in differentiation medium containing 10 kinds of fatty acids with different number of carbon chains resulted in an increase in lipid accumulation in palmitic acid treated group. Gene expression of lipid synthesis related factors increased, but gene expression of adipocyte differentiation factor did not increase. Furthermore, gene expression of chemerin increased with nine kinds of fatty acid treatment except oleic acid, and gene expression of TNF -  $\alpha$  increased in acetic acid - treated group. Since most fatty acids used in this experiment promotes gene expression of chemerin, it was suggested that chemerin was promoted secretion by fatty acid treatment regardless of adipocyte lipid accumulation and differentiation process. In addition, it was shown that Chemerin is also involved in promoting lipid metabolism of sheep matured adipocytes and proliferation of preadipocytes.

3. Creatinine treatment on sheep mature adipocytes showed a tendency to decrease intracellular lipid droplets in a concentration-dependent manner. Next, expression of PPAR- $\gamma$ 2, TNF- $\alpha$ , chemerin



and chemerin receptor genes in creatinine-treated samples was analyzed. No time-dependent increase or decrease in the expression of PPAR- $\gamma$ 2 gene by creatinine treatment was observed. In addition, the expression of TNF- $\alpha$  gene involved in lipolysis was increased in the high-concentration creatinine-treated group. Furthermore, chemerin gene expression was not affected by creatinine treatment. Expression of the chemerin receptor gene decreased in the 24-hour low concentration treatment group, but a significant increase was observed in the high concentration treatment group on 72 hours after the creatinine treatment. Expression of the chemerin gene was not altered by creatinine treatment, but it was suggested that expression of chemerin receptor gene changes in a concentration-dependent manner chronologically by creatinine treatment. These results suggested that creatinine indirectly regulates the lipolytic activity by controlling the susceptibility of sheep mature adipocytes to chemerin.

4. Bovine cultured mammary epithelial cells (MAC-T cells) were cultured in medium supplemented with and without prolactin and without addition of creatinine, at a low concentration and high concentration, and analyzed expression of chemerin receptor and  $\kappa$ -casein gene. In addition, changes in glucose, TG, NEFA and total protein concentration in the medium after culture were measured. Expression of the gene of the chemerin receptor was decreased by treatment with creatinine in the group without prolactin. This result suggests that creatinine in the prolactin absent group controls the

expression of chemerin receptor in MAC-T cells and indirectly controls the influence of chemerin on milk secretion mechanism. Expression of  $\kappa$ -casein gene was increased by treatment with high concentration of creatinine in both prolactin absent and present. In addition, the TG concentration in the medium showed a tendency to decrease due to the addition of creatinine in the group without prolactin. Total protein concentration in the medium increased by treatment with high creatinine concentration regardless of absent or present of prolactin. In particular, expression of genes of chemerin receptor and expression of  $\kappa$ -casein gene are the largest fluctuations due to creatinine addition in prolactin-added groups, and creatinine at the lactation stage was suggested to suppress the influence of chemerin and to increase secretion of milk protein including  $\kappa$ -casein.

From this study was suggested that the gene expression of chemerin and chemerin receptor is involved in the regulation of adipocytes development and mammary gland secretion function of mammary gland cells in ruminant. In addition, it is suggested that gene expression of chemerin and chemerin receptor may be regulated by fatty acid, creatinine and prolactin. Therefore, it is suggested that chemerin is a factor involved in regulation along with other substances and hormones in livestock production.

## 参考文献

Accorsi PA, Govomni N, Gaiani R, Pezzi C, Seren E, Tamanini C (2005) Leptin, GH, PRL, insulin and metabolic parameters throughout the dry period and lactation in dairy cows. *Reproduction In Domestic Animals Journal* 40: 217-223.

Argiles J-M, Lopez-Soriano J, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano F-J (2005) Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue. *Medicinal Research Reviews* 25 (1): 49-65.

Bevers M-M, Willemsse A-H, Kruijff Th-A-M (1978) Plasma prolactin levels in the sow during lactation and the postweaning period as measured by radioimmunoassay. *Biology of Reproduction* 19: 628-634.

Col R, Uslu U (2007) Changes in selected serum components in cattle naturally infected with *Theileria Annulata*. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 51: 15-18.

Doornenbal H, Tong AKW, Murray NL (1988) Reference Values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. *Canadian Journal of Veterinary Research* 52: 99-105.

- Fan P, Kyaw H, Su K, Zeng Z, Augustus M, Carter K-C, Li Y (1998) Cloning and characterization of a novel human chemokine receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243: 264-268.
- Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R (2003) Interleukin-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Hormone And Metabolic Research Journal* 35: 147-152.
- Fu Y-Y, Chen K-L, Li H-X, Zhou G-H (2016) The adipokine chemerin induces lipolysis and adipogenesis in bovine intramuscular adipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 418: 39-48.
- Hallen E, Wedholm A, Andren A, Lunden A (2008) Effect of  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 125:119-129.
- Harman A-W, Harp J-B (2001) Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280: 807- 813.

- Hu W, Feng P (2011) Elevated serum chemerin concentrations are associated with renal dysfunction in type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice* 91: 159–163.
- Huynh H-T, Robitaille G, Turner J-D (1991) Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An in vitro model for bovine lactation. *Experimental Cell Research* 197: 191-119.
- Hiraoka E, Kawashima S, Takahashi T, Rikitake Y, Kitamura T, Ogawa W, Yokoyama M (2001) TNF- $\alpha$  induces protein synthesis through PI3-kinase-Akt/PKB pathway in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 280: 1861-1868.
- Kern PA, Ranganathan P, Li C, Wood L, Ranganathan G (2001) Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 280: 745–751.
- Kim D, Choi K, Ichinohe T, Song S (2015) Effects of different roughage sources and feeding levels on adipogenesis of ovine adipocytes. *Animal Science Journal* 86 (11): 943-951.

Kim H, Seo C, Kim Y, Na M, Kang J-S, Lee W, Paik M-J (2016) Simultaneous urinary creatine and creatinine analysis by high performance liquid chromatography. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 37: 756-758.

Kovalik J-P, Slentz D, Stevens R-D, Kraus W-E, Houmard J-A, Nicoll J-B, Lea-Currie Y-R, Everingham K, Kien C-L, Buehrer B-M, Muoio D-M (2011) Metabolic remodeling of human skeletal myocytes by cocultured adipocytes depends on the lipolytic state of the system. *Diabetes* 60:1882–1893.

Latronico MVG, Condorelli G (2016) Chemerin processing in the myocardium: A mechanism in search of a function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 100: 21–24.

Lehr S, Hartwing S, Sell H (2012) Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomic Clinical Applications* 6: 91-101.

Li H-X, Chen K-L, Wang H-Y, Tang C-B, Xu X-L, Zhou G-H (2015) Chemerin inhibition of myogenesis and induction of adipogenesis in C2C12 myoblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 414 :216-223.

- Li Y-P (2003) TNF- $\alpha$  is a mitogen in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285: 370–37.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I (2013) Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN inflammation*.
- Mcbride O.W, D Korn E (1963) The lipoprotein lipase of mammary gland and the correlation of its activity to lactation. *The Journal of Lipid Research* 4: 17-20.
- Mida K, Shamay A, Argov-Argaman N (2012) Elongation and desaturation pathways in mammary gland epithelial cells are associated with modulation of fat and membrane composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10657–10665.
- Ormond A, Mac D, Charles F. B (2007) The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metabolism* 6: 159-161.
- Otto F, Vilela F, Harun M, Taylor G, Baggasse P, Bogin E (2000) Biochemical blood profile of angoni cattle in Mozambique. *Israel Journal of Veterinary medicine* 55: 1-9.

- Park P-J, Cho J-Y, Cho E-G (2017) Specific visible radiation facilitates lipolysis in mature 3T3-L1 adipocytes via rhodopsin-dependent  $\beta$ 3-adrenergic signaling. *European Journal of Cell Biology* 96: 301-311.
- Penas D-R, Bandin S-F, Rua V-G, Leal A-M, Duran D, Varela A, Potoles M, Lleti E-R, Rivera M, Dieguez C, Gualillo O, Juanatey J-R-C, Lago F (2015) The Adipokine Chemerin Induces Apoptosis in Cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 37: 176-192.
- Piccione G, Caola G, Giannetto C, Grasso F, Runzo S-C, Zumbo A, Pennisi P (2009) Selected biochemical serum parameters in ewes during pregnancy, post-parturition, lactation and dry period. *Animal Science Papers and Reports* 27: 321-330.
- Piccione G, Messina V, Marafioti S, Casella S, Giannetto C, Fazio F (2012) Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, post partum, lactation and dry periods *Veterinarija. Ir Zootechika* 80: 59-64.
- Polidori GP, Lomax MA, Docherty K (2012) Palmitate enhances the differentiation of mouse embryonic stem cells towards white adipocyte lineages. *Molecular and Cellular Endocrinology* 361 (1-2): 40-50.



- Ribeiro RA, Vale ML, Thimazzi SM, Paschoalato ABP, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ (2000) Involvement of resident macrophages and mast cells in the wrirhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology* 387 (1): 111-118.
- Roh S-G, Hishikawa D, Hong Y-h, Sasaki S (2006) Control of adipogenesis in ruminant. *Animal Science Journal* 77: 472–477.
- Roh S, Song S, Choi K, Katoh K, Wittamer V, Pamentier M, Sasaki S (2007) Chemerin--A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (4): 1013-1018.
- Roh S-G, Yutaka Suzuki, Takafumi Gotoh, Ryuichi Tatsumi, Kazuo Katoh (2016) Physiological roles of adipokines, hepatokines, and myokines in ruminants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29 (1): 1-15.
- Rotter V, Nagaev I, and Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *The Journal of biological chemistry* 278: 45777–45784.

- Rourke JL, Muruganandan S, Dranse HH, McMullen NM, Sinal CJ (2014) Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *Journal of Endocrinology* 222: 201-215.
- Rule AD, Bailey KR, Schwartz GL, Khosla S, Lieske J-C, Melton III L-J (2009) For estimating creatinine clearance measuring muscle mass gives better results than those based on demographics. *Kidney International* 75: 1071-1078.
- Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrichs A, Arner P, Eckel J (2009) Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 58:2731-2740.
- Song S-H, Fukui K, Nakajima K, Kozakai T, Sasaki S, Roh S-G, Katoh K (2010) Cloning, expression analysis, and regulatory mechanisms of bovine chemerin and chemerin receptor. *Domestic Animal Endocrinology* 39:97-105.
- 宋 相憲 (2012) 脂肪細胞の分化における adipogenin の発現とその意義. 栄養生理研究会報 56 (1): 47-54.

Steensberg A, Keller C, Starkie R, Osada T, Febbraio M-A, Pedersen B-K (2002) IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 283: 1272–1278.

Suzuki Y, Song S, Sato K, So K, Ardiyanti A, Kitayama S, Hong Y, Lee S, Choi K, Hagino A, Katoh K, Roh S (2012) Chemerin analog regulates energy metabolism in sheep. *Animal Science Journal* 83 (3): 263-267.

Suzuki Y, Hong Y-H, Song S-H, Ardiyanti A, Kato D, So K-H, Katoh K, Roh S-G (2012) The Regulation of chemerin and CMKLR1 genes expression by TNF- $\alpha$ , adiponectin, and chemerin analog in bovine differentiated adipocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25 (9): 1316-1321.

Suzuki Y, Haga S, Katoh D, So K-H, Choi K, Jung U-S, Lee H-G, Katoh K, Roh S-G (2015) Chemerin is a novel regulator of lactogenesis in bovine mammary epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 466 :283-288.

鈴木裕、中野美智、吉賀聡、中島恵一、加藤和雄、盧尚建 (2015) 反芻動物におけるヘパトカインとしての Chemerin と ANGPTL8 の発現調節. 栄養生理研究会報 59 (2): 59-68.

- Wozniak S-E, Gee L-L, Wachtel M-S, Frezza E-E (2009) Adipose Tissue: The new endocrine organ? *Digestive Diseases and Sciences* 54: 1847–1856.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Review* 80 (3): 1107-1213.
- Xu H, Yao Y, Su Z, Yang Y, Kao R, Martin C-M, Rui T (2011) Endogenous HMGB1 contributes to ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis by potentiating the effect of TNF- $\alpha$ /JNK. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 300: 913–921.
- Yamaji D, Kamikawa A, Soliman M-M, Ito T, Ahmed M-M, Makondo K, Watanabe A, Saito A, Kimura K (2007) Leptin inhibits hepatocyte growth factor-induced ductal morphogenesis of bovine mammary epithelial cells. *Japanese Journal of Veterinary Research* 54: 183-189.
- Yang H, Li F, Kong X, Yuan X, Wang W, Huang R, Li T, Geng M, Wu G, Yin Y (2012) Chemerin regulates proliferation and differentiation of myoblast cells via ERK1/2 and mTOR signaling pathways. *Cytokine* 60: 646-652.

Zhang R, Liu S, Guo B, Chang L, Li Y (2014) Chemerin induces insulin resistance in rat cardiomyocytes in part through the ERK1/2 signaling pathway. *Pharmacology* 94: 259–264.

## 報文目録

松野景・一戸俊義・宋相憲 めん羊脂肪細胞における chemerin および chemerin 受容体遺伝子発現の検討 日本緬羊研究会誌 55 号 (印刷中)  
(第 2 章の内容)

松野景・一戸俊義・宋相憲 異なる脂肪酸処理がめん羊前駆脂肪細胞の脂質蓄積および分化に及ぼす影響 日本緬羊研究会誌 55 号 (印刷中)  
(第 3 章の内容)