

平成30年6月16日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01626

研究課題名(和文) 脂肪組織リモデリングに対する運動効果：TGF- β 1-TIMP1経路を中心として研究課題名(英文) Effects of TGF- β 1-TIMP1 pathway on white adipose tissue remodeling by obesity and exercise

研究代表者

櫻井 拓也 (Sakurai, Takuya)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：20353477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肥満や運動トレーニング(TR)による脂肪組織のリモデリングに対する細胞外マトリックスの役割について、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- β 1とtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1に着目し検討を行った。高脂肪食摂取により肥満したマウスの脂肪組織では、TGF- β 1とTIMP1の発現が対照群に比べて増加したが、TRはこれらを減弱させた。また、TIMP1は脂肪細胞においてTGF- β 1によって誘導され、インスリンシグナルによる糖の取り込みを減弱させた。以上のことから、TRのインスリン感受性増加作用にTGF- β 1-TIMP1経路が関与していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined effects of TGF- β 1 and TIMP1 on WAT remodeling by exercise training (TR) and obesity. The mRNA levels of TGF- β 1 and TIMP1 in WAT of obese mice were significantly higher than those in WAT of control mice, and TR significantly attenuated the expression of these genes. The gene expression and the protein production of TIMP1 in 3T3-L1 cells were upregulated by treatment with TGF- β 1. Moreover, treatment of 3T3-L1 cells with TIMP1 resulted in attenuation of insulin-induced glucose uptake and phosphorylation of Akt. In addition, the reduction of prothymosin in 3T3-L1 cells resulted in enhanced gene expressions of TIMPs (TIMP1-3) and TGF- β 1 signaling related factors, such as dermatopontin. These results suggest that, TR improves insulin sensitivity by inhibiting the TGF- β 1-TIMP1 pathway associated with reduction of glucose uptake in WAT.

研究分野：スポーツ生化学

キーワード：脂肪組織 肥満 運動トレーニング リモデリング 細胞外マトリックス TGF- β 1 TIMP1

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪組織の肥大が原因となる肥満者やそれに伴う2型糖尿病などの生活習慣病患者の増加が世界的に大きな社会問題となっている。我が国でも、平成24年の厚生労働省の国民健康・栄養調査において、肥満者の割合が男性29.1%、女性19.4%であり、さらに、2型糖尿病が強く疑われるヒトと糖尿病の可能性が否定できないヒトを合計すると約2,050万人にのぼると報告された。したがって、効果的な肥満・生活習慣病の予防策・治療法の開発が期待される。運動は、肥満・生活習慣病の予防・改善に有効であることが広く認められており、その重要性は今後ますます大きくなると推測される。

脂肪組織は、近年の検討からアディポカインと総称される液性因子を分泌し、運動や肥満によってリモデリングを起こすことがわかってきた。さらに、肥満によるアディポカインの発現異常を介した炎症性変化が生活習慣病発症に深く関与することが多数報告されていることから、現在、注目されている臓器である。この脂肪組織のリモデリングには、脂肪細胞とそれを取り巻く細胞外マトリックス (ECM) との相互作用が重要な役割を果たしていると予想される。実際に、肥満者の脂肪組織ではECMの発現増加が観察されている。しかしながら、肥満や運動による脂肪組織のリモデリングにおけるECMの役割は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

脂肪組織中の脂肪細胞はECMに囲まれて存在しているにもかかわらず、両者の相互作用や肥満もしくは運動による脂肪組織のリモデリングに対するECM関連分子の役割については報告が少ない。申請者はこの脂肪組織のECM関連分子について検討を行っている過程で、4か月間の高脂肪食 (HFD) を与えて肥満させたマウスの内臓脂肪組織では、ECM分子であるtissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) と組織線維化関連サイトカイン・トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) の遺伝子発現が増加するが、この増加を自発運動走による運動トレーニング (TR) が減弱させるという実験結果を得た。そこで本研究は、TRや肥満による脂肪組織のリモデリングのメカニズムを、脂肪組織におけるTGF- β やTIMP1の機能を明らかにすることで解明し、脂肪組織に対する新たな運動効果を発見することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスへのHFD摂取とTRの施行

8週齢のC57BLマウスをコントロール (C) 群、HFD群とHFD + TR群に分け、HFD群には脂肪含量60%のHFD摂取を、HFD + TR群にはHFD摂取と同時に回転かごでの自発運動走によるTRをそれぞれ4か月週間施行した。

(2) 脂肪組織におけるHFD摂取やTRによる

遺伝子発現変化の検討

上記の3群のマウスの副睾丸周囲脂肪組織からtotal RNAサンプル抽出し、cDNAを合成した後、Real-time PCR法でTGF- β 、TIMP1およびprothymosin α (ProT α) の遺伝子発現変化を観察した。

(3) 脂肪細胞のTIMP1発現に対するTGF- β とProT α の影響

マウス脂肪細胞株・3T3-L1細胞にリコンビナントTGF- β (1および10 ng/ml) を12時間作用させたときの培地中へのTIMP1タンパクの放出量をELISA法で測定した。さらに、3T3-L1細胞の分化過程においてProT α のsiRNAを導入した場合のTIMP1遺伝子やTGF- β シグナル関連遺伝子の発現変化をDNAアレイで検討した。

(4) 脂肪細胞のグルコース取り込みに対するTIMP1の影響

3T3-L1細胞を無血清のDMEM培地で6時間培養した後、2-デオキシグルコースとインスリン (1 μ M) を添加して1時間後に細胞内に取り込まれた2-デオキシグルコースを比色法で測定した。さらに、インスリン添加3時間前にリコンビナントTIMP1 (2 μ g/ml) を作用させた場合の細胞内グルコース取り込みについても測定した。

(5) Western blot 解析

3T3-L1細胞を無血清のDMEM培地で6時間培養した後、インスリン (1 μ M) を添加して15分後に細胞を回収し細胞抽出液を調整した。さらに、インスリンと同時にリコンビナントTIMP1 (2 μ g/ml) を作用させた場合も同様に調整した。細胞抽出液のAktタンパク質のリン酸化と発現をWestern blot法で検討した。

(6) GST-pull down法と質量分析機を用いたTIMP1結合タンパク質の同定

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) ベクターにTIMP1遺伝子を組み込み、大腸菌でGST-TIMP1の融合タンパク質を作成した。得られた融合タンパク質をグルタチオン4Bビーズで精製した後、3T3-L1細胞抽出液と反応させ、TIMP1と結合する可能性のあるタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は質量分析機によって解析を行った。

(7) Two hybrid法によるTIMP1結合タンパク質の同定

TIMP1とDNA結合タンパクを融合したものと、その遺伝子と相互作用すると考えられる遺伝子 (mouse liver cDNA) を転写活性化遺伝子と融合させたものの双方を酵母内で発現させ反応させた。陽性を示したクローンについてはDNAシーケンス解析によりその分子を同定した。

4. 研究成果

(1) HFD摂取とTRによるマウス副睾丸周囲脂肪組織のTGF- β 、TIMP1およびProT α 遺伝子の発現変化

4か月間のHFD摂取により、副睾丸周囲の脂肪組織ではTGF- β 、TIMP1およびProT α

遺伝子の有意な発現増加が観察された。TRはそれらの発現増加を有意に減弱させた(図1)。

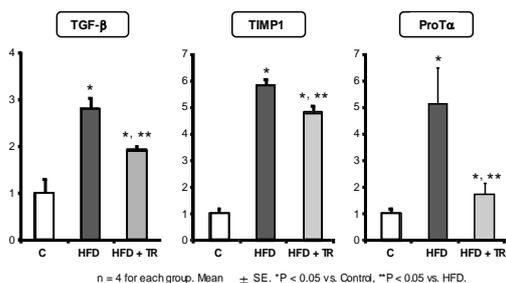


図1. 脂肪組織におけるTGF-β, TIMP1およびProTα 遺伝子の発現変化

(2) 脂肪細胞のTIMP1発現に対するTGF-βおよびProTαの影響

TGF-βは線維芽細胞でTIMP1の発現を上昇させることが報告されている。そこで、脂肪細胞のTIMP1発現に対するTGF-βの影響を検討した。その結果、TGF-βは3T3-L1細胞からのTIMP1タンパクの分泌を有意に増加させることがわかった(図2)。一方、3T3-L1細胞の分化過程においてProTαのsiRNAを導入した場合、TIMP遺伝子群(TIMP1-3)やTGF-βシグナルを調節するデルマトポンチンおよびデコリン遺伝子の発現が上昇した(表1)。

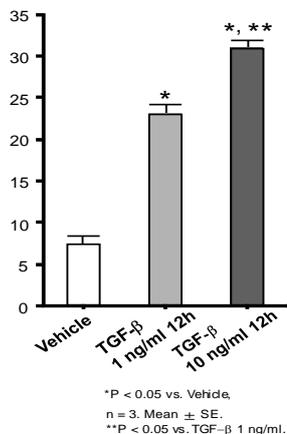


図2. 脂肪細胞のTIMP1発現に対するTGF-βの影響

表1. ProTα siRNA導入による3T3-L1細胞の遺伝子発現の変化

	si-GFP (コントロール)	si-ProTα
TIMP1	10.32	11.5
TIMP2	13.6	15.1
TIMP3	5.87	7.86
デルマトポンチン	10.9	14.4
デコリン	13	15

(3) 脂肪細胞のグルコース取り込みに対するTIMP1の影響

TIMP1は脂肪細胞の分化を抑制することが示唆されているが、分化後の成熟脂肪細胞に対する影響はわかっていない。そこで、成熟

脂肪細胞のグルコース取り込みに対するTIMP1の効果を検討したところ、TIMP1は3T3-L1細胞のインスリン刺激によるグルコース取り込みを有意に低下させた(図3)。加えて、インスリンシグナルの重要な中間因子であるAktのリン酸化もTIMP1によって抑制された(図3)。

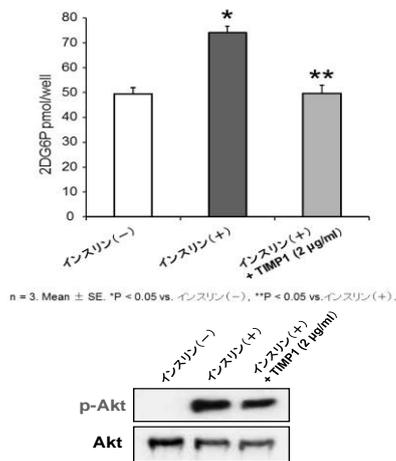


図3. 脂肪細胞の糖取り込みに対するTIMP1の影響

(4) GST-pull down法と質量分析機を用いたTIMP1結合タンパク質の同定

次に、TIMP1の作用を発揮するシグナル伝達経路を同定する目的で、TIMP1と相互作用するタンパク質の同定を試みた。結果として複数の候補タンパク質が見つかった。このうち約70 kDaのタンパク質を質量分析装置で解析したところ、ミトコンドリア外膜に存在し、タンパク質輸送などを行うTom70タンパク質であることがわかった。これらの結合は再度GST-pull downアッセイによって確認された(図4)。

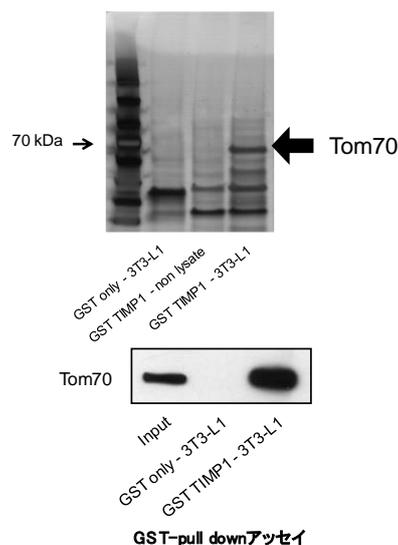


図4 GST-pull down法と質量分析機を用いたTIMP1結合タンパク質の同定

(5) Two hybrid法によるTIMP1結合タンパ

ク質の同定

Two hybrid 法による更なる TIMP1 結合タンパク質の同定を試みたところ、いくつかの陽性クローンが得られた。これらのシーケンス解析を行った結果、これまでに報告のない新規タンパク質の可能性のある遺伝子であった (表 2)。

表2. Two hybrid法によりスクリーニングされたTIMP1結合タンパク質

クローン No	シーケンス結果
1	結合しているのは、150aaのタンパク質。Smart Blast では相同タンパクは見つからなかった。
2	結合しているのは、100aaのタンパク質。上流側がrab3 GTPase-activating protein catalytic subunit isoform 1、下流がpuromycin-sensitive aminopeptidase isoform X1 と相同配列を持つ。
3	結合しているのは、60aaのタンパク質。SmartBlastでは相同タンパクは見つからなかった。

以上の結果から、TRによって発現が減弱される TGF- β -TIMP1 経路は脂肪細胞のインスリン抵抗性の惹起に関与していることが示唆された。また、TGF- β -TIMP1 経路のインスリン抵抗性の惹起には、Tom70 タンパク質などとの相互作用が関与している可能性が推測された。さらに、ProT α は TIMP 遺伝子群や TGF- β シグナル関連因子の発現を調節し、TGF- β -TIMP1 経路の制御を行っていると思われた。したがって、TGF- β -TIMP1 経路は運動トレーニングによる肥満・2型糖尿病の予防・改善のための新たなターゲットになり得ることが推測された。今回の検討結果は、肥満・TRによる脂肪組織のリモデリングのメカニズム解明に有用なエビデンスであり、今後更なる検討が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 11 件)

- ① Sakurai T, Ogasawara J, Shirato K, Izawa T, Oh-ishi S, Ishibashi Y, Radak Z, Ohno H, Kizaki T: Exercise Training Attenuates the Dysregulated Expression of Adipokines and Oxidative Stress in White Adipose Tissue. *OXID MED CELL Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 9410954, 2017. 査読有 DOI:10.1155/2017/9410954
- ② Shirato K, Imaizumi K, Sakurai T, Ogasawara J, Ohno H, Kizaki T: Regular Voluntary Exercise Potentiates Interleukin -1 β and Interleukin-18 Secretion by Increasing Caspase-1 Expression in Murine Macrophages. *Mediators of Inflammation* 2017 : 9290416, 2017. 査読有 DOI:10.1155/2017/9290416
- ③ Shirato K, Sato S, Imaizumi K, Sakurai

T, Ogasawara J, Oh-ishi S, Ohno H, Kizaki T: Regular exercise improves inflammatory responses by resident or recruited macrophages against bacterial pathogens. *Macrophage* 4: e1533, 2017. 査読有 DOI:10.14800/Macrophage.1533

- ④ Natori Y, Nasui M, Edo K, Sato S, Sakurai T, Kizaki T, Kihara-Negishi F: NEU1 sialidase controls gene expression and secretion of IL-6 and MCP-1through NF- κ B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biochemistry* 2017. 査読有 DOI:10.1093/jb/mvx006
- ⑤ Shirato K, Takanari J, Sakurai T, Ogasawara J, Imaizumi K, Ohno H, Kizaki T: Enzyme-treated asparagus extract prevents hydrogen peroxide-induced pro-inflammatory responses by suppressing p65 nuclear translocation in skin L929 fibroblasts. *Natural Product Communications* 11: 1883-1888, 2016. 査読有
- ⑥ 木崎節子, 楊 國昌, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 白土 健: 加齢性慢性炎症性疾患に対する運動効果: マクロファージ時計遺伝子をプローブとして. *杏林医学会雑誌* 47: s13-15, 2016. 査読有 URL: http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/kyorinms/journal/pdf/47/47_hois13.pdf
- ⑦ Haga S, Sakurai T, Hamaoka T, Esaki K, Ueya K, Toshinai K, Miyazaki H, Ogasawara J, Shirato K, Hashimoto N, Kastamura T, Nioka S, Chance B, Yamaguchi I, Kizaki T, Ohno H: Cerebral artery blood flow and oxygenation in the frontal lobe region in response to a judo chokehold (shimewaza). *Journal of Exercise, Sports & Orthopedics* 3: 1-8, 2016. 査読有 URL: <http://symbiosisonlinepublishing.com/exercise-sports-orthopedics/exercise-sports-orthopedics43.pdf>
- ⑧ Kizaki T, Sato S, Shirato K, Sakurai T, Ogasawara J, Izawa T, Ohira Y, Suzuki K, Ohno H: Effect of Circadian Rhythm on Clinical and Pathophysiological Conditions and Inflammation. *Critical Review in Immunology* 35: 261-275, 2015. 査読有 DOI:10.1615/CritRevImmunol.2015014925
- ⑨ Ogasawara J, Izawa T, Sakurai T, Shirato K, Ishibashi Y, Ohira Y, Ishida H, Ohno H, Kizaki T: Habitual exercise training acts as a physiological stimulator for constant activation of lipolytic enzymes in rat

primary white adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464: 348-353, 2015. 査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2015.06.157

- ⑩ Kato H, Tanaka G, Masuda S, Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H, Izawa T: Melatonin promotes adipogenesis and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Pineal Research* 59: 267-275, 2015. 査読有
DOI:10.1111/jpi.12259
- ⑪ Ogasawara J, Izawa T, Sakurai T, Shirato K, Ishibashi Y, Ishida H, Ohno H, Kizaki T: The Molecular Mechanism Underlying Continuous Exercise Training-Induced Adaptive Changes of Lipolysis in White Adipose Cells. *Journal of Obesity* 2015: 473430, 2015. 査読有
DOI:10.1155/2015/473430

[学会発表] (計 37 件)

- ① 櫻井拓也, 白土 健, 小笠原準悦, 石橋義永, 井澤鉄也, 大石修司, 芳賀脩光, 大野秀樹, 木崎節子: 肥満によって増加するプロサイモシン α は脂肪細胞の分化を促進する. 第 88 回日本衛生学会学術総会, 東京, 2018 年 3 月 22-24 日.
- ② 櫻井拓也, 白土 健, 小笠原準悦, 石橋義永, 井澤鉄也, 大石修司, 芳賀脩光, 大野秀樹, 木崎節子: 運動は肥満による脂肪組織のプロサイモシン α 発現増加を抑制する. 第 72 回日本体力医学会大会, 松山, 2017 年 9 月 16-18 日.
- ③ 櫻井拓也, 小笠原準悦, 白土 健, 石橋義永, 井澤鉄也, 大石修司, 芳賀脩光, 大野秀樹, 木崎節子: 肥満による脂肪組織のプロサイモシン α 発現増加は運動によって減弱される. 第 87 回日本衛生学会学術総会, 宮崎, 2017 年 3 月 26-28 日. 義永, 大石修司, 今泉和彦, 大野秀樹,
- ④ 櫻井拓也, 小笠原準悦, 白土 健, 石橋義永, 井澤鉄也, 大石修司, 芳賀脩光, 今泉和彦, 大野秀樹, 木崎節子: 運動は肥満による脂肪組織のプロサイモシン α 発現増加を減弱させる. 第 71 回日本体力医学会大会, 岩手, 2016 年 9 月 23-25 日.
- ⑤ 櫻井拓也, 小笠原準悦, 白土 健, 石橋義永, 井澤鉄也, 大石修司, 芳賀脩光, 大野秀樹, 木崎節子: 肥満による脂肪組織のリモデリングに対するプロサイシン α の役割. 第 86 回日本衛生学会学術総会, 旭川, 2016 年 5 月 11-13 日.
- ⑥ Ogasawara J, Sakurai T, Shirato K, Ishibashi Y, Ohno H, Kizaki T: Acute swimming exercise can accelerate the browning of skeletal muscle in interscapular region. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌, 2016 年 3 月 22-24 日.

⑦ 櫻井拓也: 運動ですてきな老後を〜認知症・アルツハイマー病予防の観点から〜. 第 165 回日本体力医学会関東地方会, 三鷹, 2015 年 11 月 28 日.

⑧ Sakurai T, Ogasawara J, Shirato K, Ishibashi Y, Ozawa T, Ohira Y, Imaizumi K, Ohno H, Kizaki T: The TGF- β -TIMP1 pathway, which inhibits glucose uptake in adipocytes, is attenuated by exercise training. The 16th International Biochemistry of Exercise Conference, São Paulo, Brazil, September 7-9, 2015.

⑨ 櫻井拓也, 小笠原準悦, 白土 健, 石橋義永, 井澤鉄也, 大野秀樹, 木崎節子: 運動トレーニングは脂肪組織の TGF- β -TIMP1 経路を減弱させる. 第 164 回日本体力医学会関東地方会, 横浜, 2015 年 7 月 11 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
櫻井 拓也 (SAKURAI Takuya)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号: 20353477

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし