

令和元年9月6日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03243

研究課題名(和文) 肥満の運動療法が影響する脂肪由来幹細胞の分化プログラムの解明

研究課題名(英文) Clarification of mechanism(s) underlying exercise training-induced possible change(s) in the differentiation potential of adipose tissue-derived stem cells

研究代表者

井澤 鉄也 (Izawa, Tetsuya)

同志社大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70147495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：内蔵脂肪組織と皮下脂肪組織には脂肪由来幹細胞(ADSC)が存在し、ADSCはそれぞれの組織に固有の脂肪細胞に分化する。本研究では、ADSCの分化能に及ぼす継続的な運動トレーニングの影響を検討した。本研究は、脂肪組織重量の増加と相関関係にある発生遺伝子群のmRNA発現に及ぼす運動の影響を明確にするとともに、ADSCの脂肪細胞への分化能が運動の影響を強く受け、その作用機序にADSCの細胞内代謝の変化が関与する可能性を明らかにしている。さらに、高脂肪食摂取がADSCの神経様細胞への分化を抑制し、こうした高脂肪食摂取の影響は運動によって改善されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動は肥満を基盤とする生活習慣病を予防・改善する極めて有用なツールである。しかし、運動療法の分子基盤には不明な点が多く残されている。とりわけ、脂肪組織に新しい脂肪細胞を補充するADSCの分化能に及ぼす運動の影響や、体脂肪分布を決定する発生遺伝子群の発現に及ぼす運動の影響については、未知の領域であった。本研究で得られた知見は、こうした未知の領域の解明に直結し、関連学術領域を大きく前進させるものである。また、本研究は新しいストラテジーによる運動療法の構築に大きなヒントを提供し、その社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Both visceral and subcutaneous adipose tissues are composed of several types of cells. Of these cells, adipose tissue-derived stem cells (ADSC) from either visceral or subcutaneous adipose tissue can be differentiated into each fat depot-specific adipocytes. The aim of the present project was to establish the effect of exercise training on the ability of ADSC into adipocytes and other type of cells. The main findings were as follows. First, fat depot-specific differences in developmental genes were found in the expressions, and some of developmental genes expressions were associated with exercise training-induced changes in adipose tissue weight. Second, exercise training affected intracellular metabolism, probably being associated with the changes in the ability of ADSC into mature adipocytes. Finally, high-fat diet impaired the differentiation ability of ADSC into neuron-like cells, but exercise training ameliorated such the high-fat diet-induced impairment of neurogenesis in ADSC.

研究分野：スポーツ生化学

キーワード：脂肪組織 脂肪組織由来幹細胞 運動トレーニング 高脂肪食摂取

1. 研究開始当初の背景

脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell, ADSC) は内蔵脂肪組織 (visceral adipose tissue, VAT) と皮下脂肪組織 (subcutaneous adipose tissue, SAT) の2つの脂肪組織に存在し、脂肪細胞が老化やアポトーシスなどによって失われるとき、ADSC が新たな脂肪細胞を補充する。このとき、VAT と SAT で見られる生物学的特性の違い (たとえば、脂肪分解反応やインスリン感受性、アディポカイン分泌応答、などが異なる) は維持される。つまり、VAT の ADSC と SAT の ADSC は、それぞれに固有の分化プログラムを持っているとされている。事実、VAT と SAT の ADSC を通常培地で分化誘導させると、VAT の ADSC は VAT に特徴的な脂肪細胞に成熟し、SAT の ADSC は SAT に特徴的な脂肪細胞に分化する。こうした知見は、VAT と SAT の ADSC はそれぞれに固有の分化プログラムを持つことを示し、成熟脂肪細胞の Hox 遺伝子群と転写カスケード (T-box など) の発現も VAT と SAT で明瞭に異なっていることが明らかになってきた。

Hox や T-box は発生分化に重要な遺伝子群で、細胞分化後も細胞記憶として刷り込まれ、細胞の形質や性質を規定する因子である。しかし、本来細胞記憶として維持されなければならない Hox 遺伝子群の発現プロファイルは、肥満時に著しく変化し、肥満度と有意な相関を示すように変化する知見が蓄積されてきている。このような知見は、「ADSC の分化プログラム」や「分化プログラムによって規定された成熟脂肪細胞の記憶 (性質)」は、脂肪組織の肥大とともに後天的に書き換えられることを強く示唆している。一方、肥満症の運動療法の効果は、肥満によって書き換えられた「ADSC の分化プログラム」や「成熟脂肪細胞の記憶」を修正して脂肪組織の機能を改善することにあるのかもしれない。しかし、その分子基盤は未知の領域である。

2. 研究の目的

以上の学術的背景を踏まえ、VAT と SAT の ADSC の分化プログラム、ならびに分化プログラムに規定された成熟脂肪細胞の記憶に及ぼす運動トレーニングの影響を発生遺伝子群の変化、細胞内のエネルギー代謝変化、ならびにエピジェネティクスの観点から明確にすることを目的として、一連の研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) 実験動物ならびに高脂肪食摂取・運動トレーニングの方法

実験動物は Wistar 系雄性ラットを用いた。実験動物は対照群、高脂肪食摂取群、普通食摂取の運動トレーニング群、高脂肪食摂取の運動トレーニング群に分けた。高脂肪食摂取群は高脂肪食 (60kcal% 脂肪含有量) を9週間摂取させた。また、運動トレーニング (以下、TR) は9週間の持久的走運動 (トレッドミル運動) をラットに課した (Biochem Biophys Res Commun, 464, 348, 2015)。このトレーニングプロトコルは体脂肪量の減少、心臓肥大、骨格筋呼吸酵素活性に有意な増加が見られる。最終トレーニング終了48時間後に、麻酔下にて脱血し、開腹後 VAT (腹膜後脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織、精巣上体脂肪組織) および SAT (背部皮下脂肪組織、鼠蹊部皮下脂肪組織) を採取し、申請らの方法 (Biochem Biophys Res Commun, 466, 512, 2015) により成熟脂肪細胞と ADSC を回収した。対照となる非運動群のラットは、運動トレーニングを課したラットと同じ週齢の時点で同様の処置を施した。

(2) ADSC の脂肪細胞や神経様細胞への分化

ADSC の成熟脂肪細胞への分化は、筆者らの方法 (Acta Physiol, 200, 325, 2010) により行った。また、ADSC の神経様細胞への分化誘導は Ashjian らの方法 (Plast Reconstr Surg, 111, 1992, 2003) に従って行った。

(3) mRNA ならびにタンパク質発現

脂肪組織ならびに primary の成熟脂肪細胞、ADSC、ADSC から分化させた脂肪細胞または神経様細胞の mRNA ならびにタンパク質発現は、それぞれ常法に従い Real-time (RT)-PCR 法とウエスタンブロット法によって定性または定量した。

(4) 細胞内エネルギー代謝系の網羅的解析

対照群, 高脂肪食摂取群, 普通食摂取の運動トレーニング群, 高脂肪食摂取の運動トレーニング群の4群の皮下脂肪組織と精巣上体脂肪組織のADSCを脂肪細胞に分化させたあと, メタボローム解析を行い細胞内代謝産物の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 脂肪組織の発生遺伝子群の発現に及ぼす運動トレーニングの影響

脂肪組織の発生・分化に関わる遺伝子群 (*Hox*, *Gpc*, *Bmp* など) の発現がSATとVATで異なり, 骨形成タンパク質 (BMP) が白色脂肪細胞の分化に関連していることが報告されている。そこで, 各脂肪組織に特異的に発現する *Hox* 遺伝子群と *Bmp* の mRNA 発現量と脂肪組織重量との相関関係に及ぼすTRの影響を検討した。その結果, 発生遺伝子群のTRに対する応答は脂肪組織の部位によって異なり(表1), *Hox*, *Gpc4*, *Bmp*, *Shox2* の mRNA 発現量と脂肪組織重量増加との相関関係もTRによって大きな影響を受けることが明らかとなった。こうした *Hox* 遺伝子群の変化がTRによる重量増加抑制効果に関わっているのかもしれない。

	Inguinal		Epididymal		Mesenteric	
	Tissue	Adipocyte	Tissue	Adipocyte	Tissue	Adipocyte
<i>HoxA5</i>	↑	↑			↓	
<i>HoxC8</i>	↓	↓				
<i>HoxC9</i>	↓	↓	↓	↓	↑	↑
<i>HoxC10</i>	↓	↓	↓	↓	↑	↑
<i>Shox2</i>	↓	↓				
<i>Gpc4</i>	↓	↓			↑	↑
<i>Tbx15</i>	↓	↓				
<i>Bmpr1a</i>	↓		↓			

表1 *Hox* 遺伝子群の発現に及ぼすTRの影響。

p<0.05 or less: ↑ 増加, ↓ 低下, 0.05<p<0.10: ↓ 低下傾向

(2) ADSCから分化させた脂肪細胞(以下, 分化脂肪細胞と称す)における代謝プロファイル
分化脂肪細胞の代謝プロファイルをメタボローム解析によって検討した。メタボローム解析の結果, 高脂肪食摂取やTRは分化脂肪細胞の解糖系やアミノ酸代謝プロファイルに著しい影響を与えることを見いだした。さらに, こうした変化は精巣上体脂肪組織に由来する分化脂肪細胞と鼠蹊部皮下脂肪組織に由来する分化脂肪細胞では異なっていることを見出した。具体的には, 精巣上体脂肪組織に由来する分化脂肪細胞の細胞内アミノ酸濃度はTRによって増加するが, 鼠蹊部皮下脂肪組織に由来する分化脂肪細胞では低下することを明らかにした。以上のように, TRや高脂肪食摂取によって影響されるADSCの脂肪細胞への分化能の変化には, 細胞内のエネルギー代謝の変化が関わっていることが示唆された。

(3) ADSCのDNAマイクロアレイ解析

ADSCの細胞内代謝応答が高脂肪食摂取や運動トレーニングで変化した現象の本質を見極めるため, 分化前のADSCのマイクロアレイによる一括した定性的検索を行なった。その結果, TRや高脂肪食摂取は代謝(解糖系, アミノ酸代謝系)ならびに分化関連遺伝子の発現変化を惹起させる事を認めた。この結果は, 脂肪組織のエネルギー状態がADSCの分化能に影響を与えること, ならびにADSCの多分化能もTRや高脂肪食摂取によって影響を受けることを強く示唆している。さらに, 脂肪組織の高エネルギーリン酸を枯渇させた試料において, 脂肪分解反応や脂肪合成反応に関わる因子のタンパク質発現についても測定した結果, 脂肪組織の高エネルギーリン酸の枯渇は, 脂質代謝ネットワークの鍵因子であるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR)αとPPARγコアクチベータのタンパク質発現に著しい影響を与えることが分かった。

(4) ADSCの神経様細胞への分化能に及ぼす高脂肪食摂取や運動トレーニングの影響

ADSCの脂肪細胞以外の細胞への分化能もTRや高脂肪食摂取による影響を受けるのか否かについて検討するため, ADSCの神経様細胞への分化能について検討した。分化能の評価として神経細胞マーカー(*nestin*, β -III tubulin, *MAP2*)の発現量を測定した。その結果, 神経細胞のマーカータンパク質の発現量や神経突起の伸長は高脂肪食摂取により有意に抑制されたが, TRは高脂肪食摂取によるADSCの神経用細胞への分化能の低下を改善させた(図1)。さらに高脂肪食摂取の神経様細胞では培地中のマロンジアルデヒド量が有意に高い値を示した

が、TRによって培地中のマロンジアルデヒド量が対照レベルにまで低下することを見出した。以上のことから、高脂肪食摂取及びTRによるADSCの神経様細胞への分化能変化には、活性酸素種が関与することが示唆された。

以上の結果は、肥満を基盤とする生活習慣病予防における運動療法の優位性にADSCの分化能変化が関与していることを強く示唆している。とりわけ、ADSCから分化させた脂肪細胞において、高脂肪食摂取やTRによってその細胞内代謝調節機構が著しく変化し、その変化がVATに由来するADSCとSATに由来するADSCで異なっているという事実は、ADSCの分化能制御機構の解明と制御を目指した今後の研究に大きなヒントを与えるものである。一方、当初の大きな目的であったエピジェネティックな変化については一定の結論を得るには至らず、今後の課題となった。しかし、この点を差し引いても、本研究は体脂肪分布やADSCの分化能の制御、ならびに栄養因子の影響等に注目した新しい運動療法の構築に貢献する重要な基盤的知見を提供している。

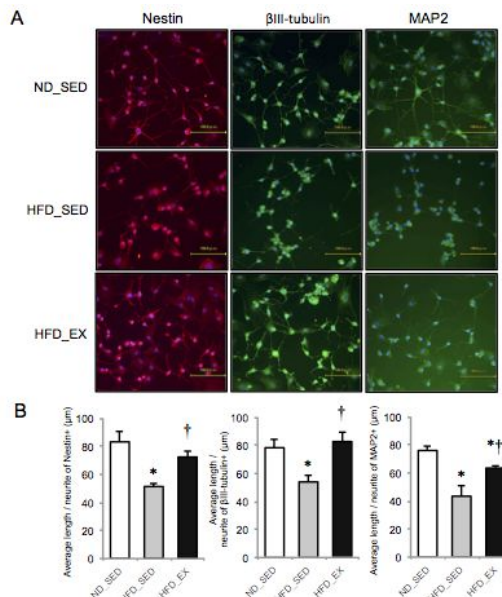


図1 高脂肪食摂取 (HFD) や運動トレーニング (TR) が ADSC の神経様細胞への分化に及ぼす影響
ND_SED : 対照群, HFD_SED : 高脂肪食群, HFD_EX : 高脂肪食摂取TR群. (J Cell Physiol, 234, 1452, 2019 より改変)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- (1) Kato H, Minamizato H, Ohno H, Ohira Y, and Izawa T. Exercise ameliorates high-fat diet-induced impairment of differentiation of adipose-derived stem cells into neuron-like cells in rats. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2): 1452-1460, 2019. (査読有)
- (2) Kato H, Shibahara T, Nazibur R, Takakura H, Ohira Y, and Izawa T. Effect of a 9-week exercise training regimen on expression of developmental genes related to growth-dependent fat expansion in juvenile rats. *Physiological Reports*, 6(19): e13880, 2018. (査読有)
- (3) Kato H, Masuda S, Ohira T, Ohira L, Takakura H, Ohira Y, Izawa T. Differential response of adipose tissue gene and protein expressions to 4- and 8-week administration of β-guanidinopropionic acid in mice. *Physiological Report*, 6(5). doi: 10.14814/phy2.13616, 2018. (査読有)
- (4) Sakurai T, Ogasawara J, Shirato K, Izawa T, Oh-Ishi S, Ishibashi Y, Radák Z, Ohno H, Kizaki T. Exercise Training Attenuates the Dysregulated Expression of Adipokines and Oxidative Stress in White Adipose Tissue. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2017:9410954, 2017. (査読有)
- (5) 井澤鉄也, 加藤久詞, 運動による脂肪組織のリモデリング, *New Diet Therapy*, 33(3): 37-44, 2017. (査読無)(招聘講演プロシーディング)

〔学会発表〕(計18件)

(国際学会)

- (1) Effect of endurance exercise training on neurogenesis of adipose-derived stem cells, isolated from fat-depot in Wistar rats. H. Kato, Y. Ohira, and T. Izawa. ISGP/ESA Life Sciences Meeting, 2018. June 18-22, 2018.
- (2) Effects of MnSOD treatment on the properties of rat soleus during gravitational unloading. Ozaki Y., Kato H., Sugiyama A., Izawa T., Hanson A.M., Ohira Y. The 33rd Annual Meeting American Society for Gravitational and Space Research. Seattle, Canada, 2017.10.
- (3) Estimation of the adaptation in the properties of rat soleus muscle to long-term stay on the Mars and the Moon. Kato H., Ueno D., Ozaki Y., Kawano F., Goto K., Izawa T., Ohira Y. The 33rd

Annual Meeting American Society for Gravitational and Space Research. Seattle, Canada, 2017.10.

- (4) Response and adaptation of skeletal muscle to endurance training based on circadian rhythms of clock gene expression. Takakura, H., H. Kato, S. Masuda, D. Ueno, M. Hieda and T. Izawa, APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise VII, 11月2-4日, 2016, Phoenix, U.S.A., 2016.
 - (5) Exercise training alters expression of developmental genes and adipogenic potential in adipocytes and adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat depots, Hisashi Kato, Hisashi Takakura, Mutsuko Hieda, Yoshinobu Ohira, Tetsuya Izawa, APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise VII, 11月2-4日, 2016, Phoenix, U.S.A., 2016.
- (国内学会)
- (6) トレーニングの回数はeNOS発現に影響するか? 稗田陸子, 高倉久志, 加藤久詞, 井澤鉄也. 第73回日本体力医学会大会. AOSSA/ハピリン(福井). 2018年9月.
 - (7) 代謝プロファイル運動トレーニングならびに高脂肪食摂取が脂肪組織由来幹細胞(ADSC)の代謝プロファイルに及ぼす影響. 井澤鉄也, 加藤久詞, 大澤晴太, 今井一貴, 高倉久志, 大平充宣. 第73回日本体力医学会大会. AOSSA/ハピリン(福井). 2018年9月.
 - (8) 脂肪由来間葉系幹細胞の神経様細胞への分化能に及ぼす高脂肪食摂取および運動トレーニングの影響. 加藤久詞, 今井一貴, 大澤晴太, 高倉久志, 大平充宣, 井澤鉄也. 第73回日本体力医学会大会. AOSSA/ハピリン(福井). 2018年9月.
 - (9) Homeobox10は褐色脂肪組織における運動トレーニング適応に関与する. 加藤久詞, 有尾拓土, 高倉久志, 大平充宣, 井澤鉄也. 第26回日本運動生理学会大会. 大阪体育大学(大阪). 2018年7月.
 - (10) 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. 櫻井拓也, 白戸健, 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, 第88回日本衛生学会学術総会(東京), 2018年3月.
 - (11) 白色脂肪細胞組織の成長に伴うホメオボックス遺伝子群の変化と運動トレーニングの影響. 井澤鉄也, 加藤久詞, 高倉久志, 大平充宣. 第72回日本体力医学会. 第72回日本体力医学会(松山), 2017年9月.
 - (12) 褐色脂肪組織の発生遺伝子に及ぼす運動トレーニングおよび高脂肪食摂取の影響. 加藤久詞, 有尾拓土, 高倉久志, 大平充宣, 井澤鉄也. 第72回日本体力医学会(松山), 2017年9月.
 - (13) 肥満による脂肪組織のプロモサイシン α 発現増加は運動によって減弱される, 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, 第87回日本衛生学会学術総会(宮崎), 2017年3月.
 - (14) 褐色脂肪組織のホメオボックスファミリー遺伝子と骨形成タンパク質(BMP)に及ぼす運動トレーニングの影響, 有尾拓土, 田中剛貴, 加藤久詞, 井澤鉄也, 第31回体力医学会近畿地方会(大阪), 2017年2月.
 - (15) eNOSの日内変動と運動トレーニングの影響について. 稗田陸子, 高倉久志, 加藤久詞, 井澤鉄也, 第71回日本体力医学会(岩手県), 2016年9月.
 - (16) 時計遺伝子発現リズムに基づいた一過性運動が骨格筋の応答に及ぼす影響について. 高倉久志, 上野大心, 加藤久詞, 増田慎也, 稗田陸子, 井澤鉄也, 第71回日本体力医学会(岩手), 2016年9月.
 - (17) 皮下脂肪組織・内臓脂肪組織の発生遺伝子に及ぼす運動トレーニングの影響, 加藤久詞, Minas Nalbandian, 高倉久志, 稗田陸子, 井澤鉄也, 第71回日本体力医学会大会(岩手), 2016年9月.
 - (18) 時計遺伝子BMAL1の発現リズムに基づいた運動トレーニングは脂肪分解反応に違いをもたらす. 加藤久詞, 高倉久志, 井澤鉄也, 第24回日本運動生理学会大会(熊本) 2016年7月.

[その他]

ホームページ: 同志社大学スポーツ健康科学部スポーツ生化学研究室 Izawa Laboratory

<https://izawalab.wixsite.com/izawalab>

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：加藤 久詞
ローマ字氏名：(KATO, Hisashi)
所属大学：同志社大学
部局名：スポーツ健康科学部
職名：助手
研究者番号：30780275

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高倉 久志
ローマ字氏名：(TAKAKURA, Hisashi)
所属大学：同志社大学
部局名：スポーツ健康科学部
職名：助教
研究者番号：20631914

(3) 研究協力者

研究協力者氏名：小笠原 準悦
ローマ字氏名：(OGASAWARA, Junetsu)
所属大学：旭川医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号：20415110

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：櫻井 拓也
ローマ字氏名：(SAKURAI, Takuya)
所属大学：杏林大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号：20353477