

平成21年5月15日現在

研究種目：	基盤研究 (B)
研究期間：	2007~2008
課題番号：	19300223
研究課題名 (和文)	肥満による脂肪組織の慢性炎症に対する運動効果：その分子機構とマクロファージの役割
研究課題名 (英文)	Effect of physical exercise on obesity-induced adipose chronic inflammation: its molecular mechanism and the participation of macrophages
研究代表者	
	大野 秀樹 (OHNO HIDEKI)
	杏林大学・医学部・教授
	研究者番号：00133819

研究成果の概要：運動トレーニングは、内臓脂肪の酸化ストレスと、マクロファージ関連の炎症性アディポカインの発現を減少させた。酸化ストレスの低下は、抗酸化酵素の上昇によっていた。さらに、運動トレーニングはマクロファージによる細胞性免疫反応を増強し、一酸化窒素産生能を亢進して、感染防御能を高めることが示唆された。脂肪組織に対する効果は、皮下脂肪よりも内臓脂肪に強く現れる事実は、運動トレーニングが生活習慣病の予防・治療に有用であることを示唆する。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・運動とトレーニングの分子機構

キーワード：運動、肥満、脂肪組織、マクロファージ、慢性炎症、アディポカイン、一酸化窒素、活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 非ステロイド系抗炎症薬であるアスピリンを大量投与すると血糖降下作用を示すことが19世紀後半から知られていた。しかし、その作用機序は長らく不明のままであった。最近、生活習慣病が大きな社会問題になるにつれて、改めてアスピリンの有するこのユニークな性質にスポットライトが当たった。すなわち、慢性炎症が2型糖尿病や、その最大の誘因の1つと考えられている肥満の病因なのではないか、と。その後、国内外で

精力的に研究が行われ、白色脂肪組織とマクロファージを中心に慢性炎症とそれに起因するインスリン抵抗性の分子機構が徐々に明らかになってきた。ライフスタイルの欧米化に伴って肥満、糖尿病、高血圧、動脈硬化疾患などの生活習慣病の罹患率が増加しており、これらの克服は国民医療の観点から極めて重要な課題である。

(2) 生活習慣病に対して、運動が有力な予防・治療効果を有することが広く認められ、盛んに実施されている。そこで、肥満による

慢性炎症に対する運動効果に非常に興味もたれる。しかしながら、この観点から実施された研究は、これまでにほとんどみられていない。

## 2. 研究の目的

まだほとんど未開拓な肥満による白色脂肪組織の慢性炎症に対する運動効果を、白色脂肪組織とマクロファージのクロストークを絡めて分子レベルで追求することを目的とする。肥満による白色脂肪組織の慢性炎症は2型糖尿病をはじめとするさまざまな生活習慣病の誘因と考えられ、生活習慣病の予防・治療の重要なツールである運動はこの慢性炎症にも有効であることが予想され、そのメカニズムを分子レベルで知ることは、肥満に伴う生活習慣病の新しい安全な運動療法の開発に寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 脂肪組織の酸化ストレスと炎症性アディポカイン発現に対する運動トレーニングの影響の検討

#### ①運動トレーニングラットの作成

Wistar 系雄性ラットを用い、コントロール (C) 群とトレーニング (TR) 群に分けた。運動トレーニングは5週齢のラットに、週5日間、9週間のトレッドミル走行を実施した。運動強度は、15 m/分、15 分間から始め、最後の2週間は30 m/分、90 分間の運動を実施した。

#### ②脂肪組織内の活性酸素量の検討

C 群と TR 群の副睾丸周囲、後腹膜周囲および皮下から脂肪組織を採取した。採取した各脂肪組織中の活性酸素量をチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) で測定した。

#### ③脂肪細胞における遺伝子発現の検討

C 群と TR 群の副睾丸周囲から、Rodbell の方法によって脂肪細胞を単離した。単離した脂肪細胞から total RNA を抽出した後、RT-PCR 法で遺伝子発現を検討した。各遺伝子の発現量は  $\beta$ -actin 遺伝子の発現量で補正を行い、グラフを作成した。

#### ④脂肪組織におけるタンパク量発現の検討

各脂肪組織からタンパク抽出液を調整し、SOD アイソザイム、TNF- $\alpha$  ならびに MCP-1 の脂肪組織含有量を ELISA 法で、活性酸素産生酵素である NADPH oxidase 複合体の触媒サブユニットである NOX2 のタンパク量発現を Western 法で検討した。Western 法で検出されたバンドは GAPDH の発現量で補正を行い、グラフを作成した。さらに、活性酸素によって活性化され、MCP-1 の発現に重要であると報告されている ERK1/2 のリン酸化を Western 法で検討した。ERK1/2 のリン酸化 (p-ERK1 もしくは p-ERK2) は ERK1/2 の発現量で補正を行い、グラフを作成した。

### (2) 運動トレーニングがマクロファージ機能に与える影響の検討

#### ①運動トレーニング

10 週齢の BALB/c マウスをコントロール群 5 匹とトレーニング群 5 匹に分け、トレーニング群には、18 m/分、30 分間/日、5 日間/週、計 3 週間のトレッドミルトレーニングを行った。急性運動の影響を除くため、最後のトレーニング運動から 24 時間以上経ってから、腹腔マクロファージを採取した。

#### ②リステリア感染防御能の解析

Brain Heart Infusion Broth (BHI broth) に懸濁したリステリア生菌 (*L. monocytogenes*) をマクロファージに貪食させ、洗浄後、ゲンタマイシンによりマクロファージ細胞外のリステリア生菌を殺菌した。0 および 1 時間後に細胞を溶解し、BHI broth 寒天培地で培養した。翌日、寒天培地のコロニー数から細胞内のリステリア生菌数を算出し、感染防御能を解析した。

#### ③ $\beta_2$ アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) 強発現マクロファージ細胞株の樹立と $\beta_2$ AR 過剰発現抑制

テトラサイクリンオペレーター配列をもつ発現ベクターに  $\beta_2$ AR cDNA を組み込み、マクロファージ細胞株 (RAW264) にトランスフェクトして  $\beta_2$ AR 強発現株を樹立した。次に、テトラサイクリンリプレッサー発現ベクターをコ・トランスフェクトし、 $\beta_2$ AR の発現量を低下させた。

#### ④サイトカインの測定

マクロファージを LPS 刺激し、上清中の IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ 、IL-10 濃度を ELISA 法で、一酸化窒素 (NO) 濃度は Griess 法で測定した。

#### ⑤ RT-PCR : マクロファージから TRIzol 試薬を用いて全 RNA を抽出した。さらに、逆転写酵素により cDNA を調整し、PCR 反応に用いた。

#### ⑥ Western blotting

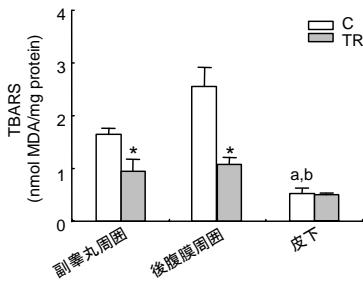
細胞から細胞質タンパク質と膜タンパク質を抽出し、10%SDS ポリアクリルアミド電気泳動法により分離した。PVDF 膜にブロッティングしたのち、一次抗体を反応させた。次に、HRP 標識二次抗体を反応させ、ECL 法によりターゲット分子を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪組織の酸化ストレスと炎症性アディポカイン発現に対する運動トレーニングの影響の検討

#### ①脂肪組織の酸化ストレスに対する運動トレーニングの影響

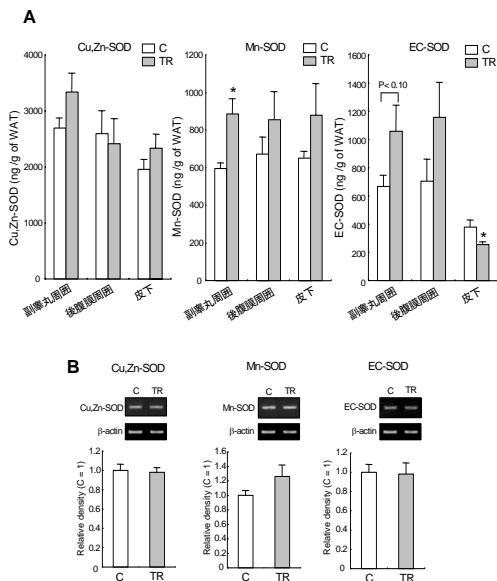
C 群において、副睾丸と後腹膜周囲脂肪組織の TBARS は、皮下脂肪に比べて有意な高値を示した (図 1)。運動トレーニングは、皮下脂肪組織の TBARS を変化させなかったが、副睾丸と後腹膜周囲脂肪組織の TBARS を有意に減少させた (図 1)。



**図1 脂肪組織のTBARSに対する運動の影響**  
 Values are the mean ± SE (n = 5 for each group).  
<sup>a</sup>p < 0.05 vs. 副睾丸周囲脂肪組織, <sup>b</sup>p < 0.05 vs. 後腹膜周囲脂肪組織, \*p < 0.05 vs. C 群.

②脂肪組織におけるSODアイソザイム発現に対する運動トレーニングの影響

TR 群の副睾丸周囲脂肪組織の Mn-SOD タンパク量は、C 群に比べて有意に増加した (図 2A)。この運動トレーニングによる Mn-SOD の増加は後腹膜周囲と皮下脂肪組織では観察されなかった。また、TR 群の副睾丸周囲脂肪組織の EC-SOD タンパク量は、C 群に比べて増加傾向が観察されたが、皮下脂肪組織では逆に有意に減少した (図 2A)。Cu, Zn-SOD に関しては、運動トレーニングによる変化は観察されなかった (図 2A)。一方、副睾丸周囲脂肪細胞における SOD アイソザイム遺伝子の発現は C 群と TR 群の間に差は認められなかった (図 2B)。



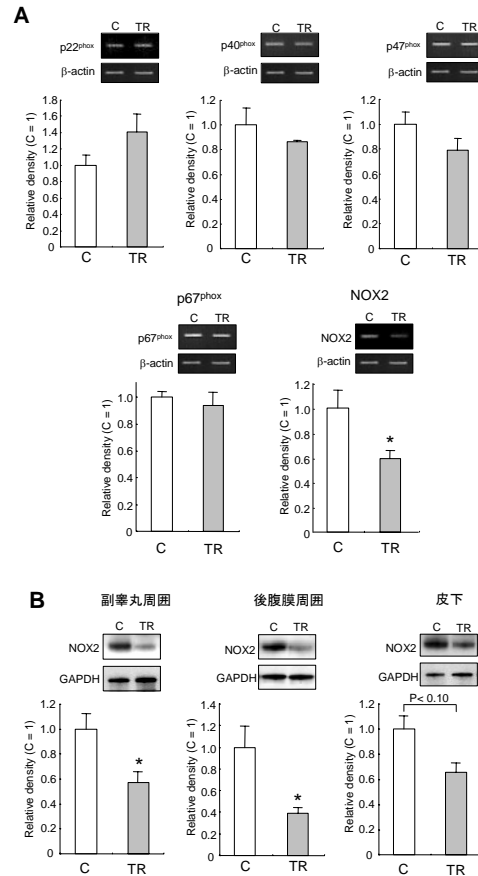
**図2 脂肪組織におけるSODアイソザイム発現に対する運動トレーニングの影響**

- A. 各脂肪組織におけるSODアイソザイムタンパク量の変化  
 B. 副睾丸周囲脂肪細胞におけるSODアイソザイム遺伝子発現の変化  
 Values are the mean ± SE (A: n = 5 for each group, B: n = 4 for each group). \*p < 0.05 vs. C 群.

③脂肪組織におけるNADPH oxidase発現に対する運動トレーニングの影響

次に、活性酸素産生酵素である NADPH oxidase の各サブユニットの発現を検討した。

TR 群の副睾丸周囲脂肪細胞の NOX2 遺伝子の発現は C 群に比べ有意に低下した (図 3A)。他のサブユニット (p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> および p67<sup>phox</sup>) の遺伝子発現は両群に差はみられなかった (図 3A)。加えて、NOX2 のタンパク量発現は副睾丸と後腹膜周囲脂肪組織で有意に低下し、皮下脂肪組織でも減少傾向がみられた (図 3B)。



**図3 脂肪組織におけるNADPH oxidase発現に対する運動トレーニングの影響**

- A. 副睾丸周囲脂肪細胞におけるNADPH oxidaseの各サブユニットの遺伝子発現の変化  
 B. 各脂肪組織におけるNOX2タンパク量の変化  
 Values are the mean ± SE (A: n = 4 for each group, B: n = 5 for each group). \*p < 0.05 vs. C 群.

④脂肪組織における炎症性アディポカイン発現に対する運動トレーニングの影響

脂肪細胞で酸化ストレスによって制御されると報告されている炎症性アディポカイン TNF- $\alpha$  と MCP-1 の発現変化について検討を行った。副睾丸周囲脂肪細胞における TNF- $\alpha$  と MCP-1 の遺伝子発現は運動トレーニングによって有意に低下した (図 4A)。C 群において、副睾丸と後腹膜周囲脂肪組織の TNF- $\alpha$  タンパク量は、皮下脂肪に比べて有意な高値を示した (図 4B)。運動トレーニングは、皮下脂肪組織での TNF- $\alpha$  タンパク量を変化させなかったが、副睾丸と後腹膜周囲脂肪組織の TNF- $\alpha$  タンパク量を有意に減少させた (図 4B)。また、C 群において、副睾丸

周囲脂肪組織の MCP-1 タンパク量は皮下脂肪組織に比べて有意に高く、TR 群の 3 部位すべての脂肪組織の MCP-1 タンパク量は、それぞれ C 群に比べて有意な低値を示した。加えて、血漿中の MCP-1 タンパク量も TR 群で有意に低下した (図 4C, D)。

⑤ERK のリン酸化に対する運動トレーニングの影響

シグナル伝達分子である ERK は、活性酸素によって活性化され、脂肪細胞において MCP-1 の発現を制御している。したがって、運動トレーニングによる脂肪組織の酸化ストレス減少と MCP-1 の発現低下のメディエーターとなることが予想された。そこで、ERK のリン酸化に対する運動トレーニングの影響を検討した。TR 群の副睾丸と後腹膜周囲脂肪組織の ERK1 のリン酸化は C 群に比べて有意に低下し、ERK2 のリン酸化は低下傾向が観察された (図 5)。逆に、皮下脂肪では運動トレーニングによって ERK2 のリン酸化が有意に増加し、ERK1 のリン酸化も増加傾向にあった (図 5)。

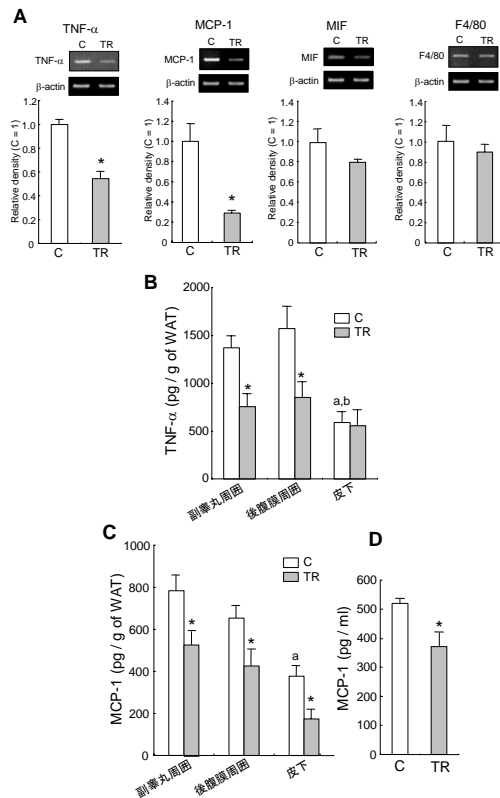


図 4 脂肪組織における炎症性アディポカイン発現に対する運動トレーニングの影響

A. 副睾丸周囲脂肪細胞における炎症性アディポカインの遺伝子発現の変化  
 B. 各脂肪組織における TNF- $\alpha$  タンパク量の変化  
 C. 各脂肪組織における MCP-1 タンパク量の変化  
 D. 血漿中の MCP-1 タンパク量の変化  
 Values are the mean  $\pm$  SE (A: n = 4 for each group, B-D: n = 5 for each group). \*p < 0.05 vs. 副睾丸周囲脂肪組織, <sup>b</sup>p < 0.05 vs. 後腹膜周囲脂肪組織, \*p < 0.05 vs. C 群.

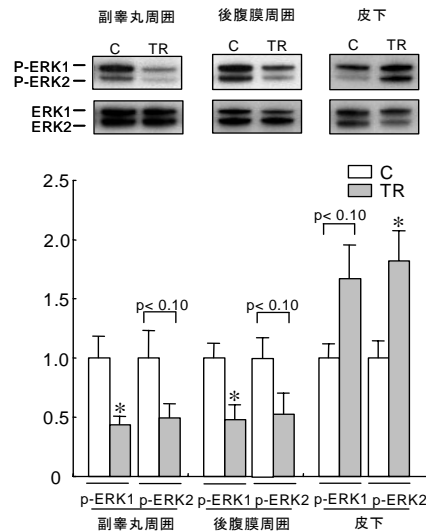


図 5 ERK のリン酸化に対する運動トレーニングの影響

Values are the mean  $\pm$  SE (n = 5 for each group). \*p < 0.05 vs. C 群.

## (2) 運動トレーニングがマクロファージ機能に与える影響の検討

### ①運動トレーニングの感染防御能への影響

細胞内リステリア増殖の抑性能は、運動トレーニング群で増強された (図 1)。さらに、運動トレーニング群では、Th1 タイプのサイトカイン、IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$  と NO の産生能が亢進し、Th2 タイプのサイトカイン IL-10 の産生能が低下した (図 2)。

図 1 運動トレーニングのリステリア感染防御能への影響

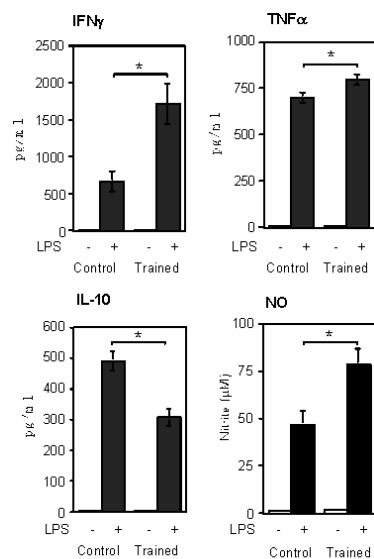


図 2 運動トレーニングのサイトカインと NO 産生能への影響

②  $\beta_2$ ARの発現量の変化がNO産生能へ与える影響

トレーニング群のマウスの腹腔マクロファージには、対照群と比べて $\beta_2$ ARの発現量の低下が見られ(図3)。そこで $\beta_2$ AR過剰発現マクロファージ細胞株におけるNO合成酵素(NOS2)のmRNAとタンパク質発現量を検討した結果、ベクターのみをトランスフェクトしたコントロール細胞株と比べて有意に低下した(図4)。さらに、トランスフェクトした $\beta_2$ ARの発現を低下させると(図5)、LPS刺激によるNOS2の発現とNO産生量に有意な回復が見られた(図6)。

以上の結果から、運動トレーニングはTh1細胞が制御する細胞性免疫反応を増強するとともに、 $\beta_2$ ARの発現量を低下し、NO産生能の亢進することにより感染防御能を高めることが示唆された。



図3 運動トレーニングの $\beta_2$ AR発現量への影響

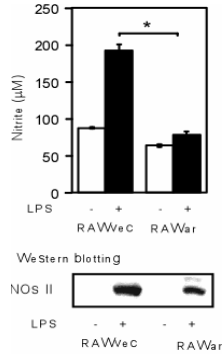


図4  $\beta_2$ AR過剰発現によるNO産生能の変化

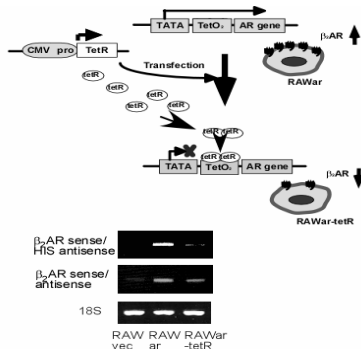


図5 テトラサイクリンリプレッサーによる $\beta_2$ AR発現抑制

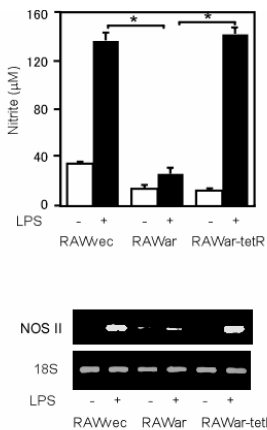


図6  $\beta_2$ AR発現抑制によるNO産生能の変化

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13件)

- ① Ohno, H., Haga, S., Takemasa, T., Sakurai, T., Ogasawara, J., Shirato, K., Ishibashi Y., Imaizumi, K. and Kizaki T.: Swimming training prevents induction of suppressor macrophages in mice during acute exposure to cold. *Adv. Exerc. Sports Physiol.* in press, 2009, 査読有
- ② Kizaki, T., Shirato, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Oh-Ishi, S., Matsuoka, T., Izawa, T., Imaizumi, K., Haga, S. and Ohno, H.:  $\beta$ -Adrenergic receptor regulates Toll-like receptor 4-induced TRIF-dependent late-phase NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Immunol.* 46: 1195-1203, 2009, 査読有
- ③ Sakurai, T., Izawa, T., Kizaki, T., Ogasawara, J., Shirato, K., Imaizumi, K., Takahashi, K., Ishida, H. and Ohno, H.: Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 605-609, 2009, 査読有
- ④ Ogasawara, J., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Sakurai, T., Kizaki, T., Izawa, T., Ishida, H. and Ohno, H.: Effect of Oligonol, low-molecular form of lychee fruit-derived polyphenol, on lipolysis in primary rat adipocytes. *Phytother. Res.* in press, 2009, 査読有
- ⑤ Sakurai, T., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Kizaki, T., Kondoh, Y., Izawa, T., Ishida, H., Radák, Z. and Ohno H.: Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J. Nutr. Biochem.* in press, 2009, 査読有
- ⑥ Takahashi, K., Yamaguchi, S., Shimoyama, T., Seki, H., Miyokawa, K., Katsuta, H., Tanaka, T., Yoshimoto, K., Ohno, H., Nagamatsu, S. and Ishida, H.: JNK- and I $\kappa$ B-dependent pathways regulate MCP-1 but not adiponectin release from artificially hypertrophied 3T3-L1 adipocytes preloaded with palmitate in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E898-E909, 2008, 査読有
- ⑦ Kizaki, T., Takemasa, T., Sakurai, T., Izawa, T., Hanawa, T., Kamiya, S.,

- Haga, S., Imaizumi, K. and Ohno, H.: Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372: 152-156, 2008, 査読有
- ⑧ Ogasawara, J. and Abe, T.: Amino acid mixture identical to vespa larval saliva increases both leptin secretion and basal lipolysis in rat adipocytes. *Food Sci. Technol. Res.* 14: 95-98, 2008, 査読有
- ⑨ Kizaki, T., Izawa, T., Sakurai, T., Haga, S., Taniguchi, N., Tajiri, H., Watanabe, K., Day, N.K., Toba, K. and Ohno, H.:  $\beta$ -adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation through  $\beta$ -arrestin 2. *Immunology* 124: 348-356, 2008, 査読有
- ⑩ Sakurai, T., Nishioka, H., Fujii, H., Nakano, N., Kizaki, T., Radak, Z., Izawa, T., Haga, S. and Ohno, H.: Antioxidative effects of a new lychee fruit-derived polyphenol mixture, Oligonol, converted into a low-molecular form in adipocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 463-476, 2008, 査読有
- ⑪ Ohno, H., Sakurai, T., Hisajima, T., Abe, S., Kizaki, T., Ogasawara, J., Ishibashi, Y., Imaizumi, K., Takemasa, T., Haga, S., Kitadate, K., Nishioka, H. and Fujii, H.: The Supplementation of Oligonol, the new lychee fruit-derived polyphenol converting into a low-molecular form, has a positive effect on fatigue during regular track-and-field training in young athletes. *Adv. Exerc. Sports Physiol.* 13: 93-99, 2008, 査読有
- ⑫ Nakano, N., Miyazawa, N., Sakurai, T., Kizaki, T., Kimoto, K., Takahashi, K., Ishida, H., Takahashi, M., Suzuki, K. and Ohno, H.: Gliclazide inhibits proliferation but stimulates differentiation of white and brown adipocytes. *J. Biochem.* 142: 639-645, 2007, 査読有
- ⑬ Sakurai, T., Takei, M., Ogasawara, J., Ueda, H., Kizaki, T., Ohno, H. and Izawa, T.: Exercise before or after refeeding prevents refeeding-induced recovery of cell size after fasting with a different pattern of metabolic gene expressions in rat epididymal adipocytes. *Metabolism* 56: 1270-1278, 2007, 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Sakurai, T. et al.: New lychee fruit-derived polyphenol Oligonol converted into a low-molecular form improves exercise-induced fatigue. 3rd Symposium of Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, Apr. 8-10, 2009, Paris.
- ② 櫻井拓也ほか: 脂肪組織由来幹細胞の脂肪および血管内皮細胞への分化に対する運動トレーニングの影響. 第79回日本衛生学会学術総会、2009年3月29日-4月1日、東京.
- ③ 小笠原準悦ほか: 急性運動による脂肪細胞の脂肪分解反応のメカニズム. 第79回日本衛生学会学術総会、2009年3月29日-4月1日、東京.
- ④ 木崎節子ほか: 運動トレーニングによる免疫機能の修飾: マクロファージを中心として. 文部科学省学術フロンティア研究プロジェクト「ライフステージに応じた健康増進と多様性保持」第3回研究発表会、2009年1月6-7日、所沢.

[図書] (計1件)

- ① 小笠原準悦、櫻井拓也、北舘健太郎、西岡浩、藤井 創、白土 健、石橋義永、木崎節子、井澤鉄也、斎藤大蔵、今泉和彦、大野秀樹: ラット初代培養脂肪細胞の脂肪分解反応に及ぼすオリゴノールの効果. In: *Proc. of Functional Polyphenol Symposium: Novel Use of Low Molecular Polyphenol: Oligonol*、札幌、2008、p. 31-36.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大野 秀樹 (OHNO HIDEKI)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 00133819

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

木崎 節子 (KIZAKI TAKAKO)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00322446  
櫻井 拓也 (SAKURAI TAKUYA)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 20353477  
小笠原 準悦 (OGASAWARA JUNNETSU)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 研究者番号: 20415110