

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500627

研究課題名（和文） 脂肪細胞の分化・小型化過程とアディポネクチン分泌に及ぼす運動頻度・持続期間の影響

研究課題名（英文） The effects of frequency and duration of exercise on the differentiation and miniaturization of adipocyte and the secretion of adiponectin

研究代表者

木村 真規（KIMURA MASAKI）

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：40383666

研究成果の概要（和文）：本研究では、肥満ラットに 17 週齢から 2 週間の自発走運動（EX-2w 群）と、15 週齢から 4 週間に渡る 2 日に 1 回程度の自発走運動（EX-4w 群）を行わせたと、EX-2w 群よりも EX-4w 群で脂肪細胞サイズが小型化し、血中アディポネクチン濃度は有意に高値であったことから、短い期間で急速に体重を減少させる運動よりも、長い期間でゆっくりと体重を減少させる運動の方が脂肪細胞サイズを小型化し、血中アディポネクチン濃度を高値に維持できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Obese rats were randomly assigned to either the 2 (17 to 19-week-old, everyday) or 4 (15 to 19-week-old, about every two day) weeks voluntary exercise or control group. Compared to 2 weeks exercise, 4 weeks exercise promoted the downsizing of adipocyte and provided the weak reduction in the value of the blood adiponectin concentration. These results suggested that the low frequency and long duration exercise therapy is more effective for the cellularity of adipocyte and maintenance of blood adiponectin concentration compared to the high frequency and short duration exercise therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：運動生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 ・ 応用健康科学

キーワード：肥満，運動療法，食事療法，脂肪細胞，アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

肥満を伴う高血糖，高血圧，高脂血症では，それぞれの病態は軽微であっても心血管イベントの発症率が急増することから，これらの病態（メタボリックシンドローム）の予防手段として肥満の早期改善が重要視されている．近年，小型の脂肪細胞から分泌される善玉のアディポネクチンや，大型の脂肪細胞から分泌される悪玉の TNF- α はメタボリッ

クシンドロームの病態形成において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある．特にアディポネクチンはインスリン抵抗性改善や抗動脈硬化作用を有することから，肥満を改善してアディポネクチンを増加させる介入方法が注目されている．肥満の予防法として，運動や食事などの生活習慣の改善が重視されるが，我々は先行研究において食事療法と比較して運動療法は内臓脂肪

量を特異的に減少させ、メタボリックシンドローム予防に効果的である可能性を明らかにした。しかし、過度の食事療法や運動療法では血中のアディポネクチンが増加しにくく(Kimuraら, 2006)、運動による体重減少とアディポネクチン分泌との関係には不明な点が多く残されている。我々は運動時におけるアディポネクチン分泌抑制機序としてテストステロンの関与について報告したが(Kimuraら, 2006)、同時に他の因子も関与する可能性が示唆された。invitroの研究では、ストレス因子のグルココルチコイドや炎症性サイトカインのTNF- α によってアディポネクチンの発現・分泌は抑制される可能性が示唆されており(Fasshauerら, 2002, Halleuxら, 2001, Maedaら, 2001)、過度の食事制限や短期間の高強度運動ではこれらの因子の増加によってアディポネクチン分泌が抑制される可能性が考えられた。また、我々が行った予備的検討では、急激な体重減少時において脂肪組織内にマクロファージ様細胞の浸潤が観察された。脂肪組織の中に浸潤するマクロファージ様の細胞は、TNF- α などのサイトカインを分泌することによってアディポネクチンの発現・分泌を抑制している可能性が報告されている(Weisbergら, 2003, Xuら, 2003)。しかし、これまで報告された脂肪組織内へのマクロファージの浸潤は、過度の肥満などで観察される大型脂肪細胞の組織中のみであり、急激な体重減少時の脂肪細胞でマクロファージの浸潤を観察した報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動療法時におけるアディポネクチンの分泌抑制機序を明らかにすることであり、その方法として運動療法および食事療法を、その程度や頻度を調節することによって実施し、体重の減少速度とアディポネクチン分泌および組織マクロファージなどの異質な細胞像の存在との関係について明らかにするために、以下の2点から検討を行う。

(1). 脂肪細胞の分化・小型化過程における脂肪組織中のアディポネクチン分泌抑制遺伝子の発現について観察し、脂肪組織ホモジネートサンプル中のアディポネクチン遺伝子発現量および蛋白合成量、血液中のアディポネクチン濃度および分子量別分画との関係を明らかにする。

(2). 脂肪組織の病理学・免疫組織化学的観察を行い、アディポネクチン分泌抑制因子と関連する組織形態学的変化およびマクロファージ浸潤の定性・定量評価を行い、上記のアディポネクチン分泌抑制因子との関係を

明らかにする。

3. 研究の方法

(1). 研究計画・方法についての要旨

本研究では、平成20~22年の3年間に亘る実験を行う。本研究で用いる過食性肥満モデルのOLETFラットは4~5週齢のみ入手可能なことから、本研究で使用するまでに約2ヶ月の飼育期間を必要とする。13週齢までは、4匹ずつ集合ケージにて飼育し、餌(CE-2, 日本クレア)および水(水道水)はad lib摂取とする。全てのラットは13週齢より個別ケージにて飼育し、2週間の予備飼育を実施する。15週齢より4週間の運動療法および食事療法による介入を開始し、2週間の介入群は17週齢より運動療法および食事療法を開始する。介入期間中は、毎日、体重および摂餌量の計測を行い、食事療法群の給餌量を調節する。19週齢時に解剖およびサンプリングを行い、順次、血液および臓器サンプルの測定を行う。被験動物の飼育は、概ね8~10月、翌年4~6月を1クールとして、それぞれ平成20年度と21年度に実施し、合計4クールの飼育プログラムを遂行する。

(2). 体重減少速度を調節した各種療法モデル動物の作成

・回転ケージを用いた自発走運動による運動療法モデルの作成

13週齢の過食性肥満モデルOLETFラット(48匹)を対象に、個別ケージ(39×13×14cm)にて2週間の予備飼育後、併設された回転ケージ(周囲長1.18m, 幅10cm)を用いた自発走運動による運動療法を開始する。飼育期間中、餌(CE-2, 日本クレア)および水(水道水)はad lib摂取とする。運動量は回転ホイールへのアクセスを毎日(週7日)可能にする(Ex-2w)群と、敷居板にて週4日に制限する(Ex-4w)群を設けることによって調節し、体重が非肥満コントロールモデルLETOラット(LETO群, 8匹, OLETFラットと同様に入手。餌・水はad libで飼育)の体重(目標体重)までに達した時点で下記項目についてのサンプリングを行う。また、非運動対照(CONT)群(OLETFラット, 16匹)を設定する。

・摂餌量を調節した2種類の体重減少速度による食事療法モデルの作成

13週齢のOLETFラット(48匹)を対象に、個別ケージ(39×13×14cm)にて2週間のad lib食での予備飼育の後、体重減少速度が各運動群(週7および4日運動群)のそれと一致する様に摂餌量を毎日調整して制限し、体重が上記の目標体重に達した時点でサンプリングを行う(それぞれFR-2w群, FR-4w群)。

(3). サンプリング方法および測定・評価項目

各種モデル動物作成後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下(50mg/kg, i.p.)にて総頸動脈にカテーテルを挿入し、全血採血を行う。得られた血液は遠心分離後、上清を-80で保存する。次に、運動効果の評価として下肢筋重量(前脛骨筋, EDL, 腓腹筋, ヒラメ筋, 足底筋)を摘出して秤量する。また、各種脂肪組織(皮下脂肪, 副睾丸周囲脂肪, 後腹膜脂肪, 腸管膜脂肪, 大網周囲脂肪)は、摘出・秤量後、一部をRNA抽出用にドライアイスにて急速凍結し、-80で凍結保存する。また、一部は組織形態学的観察用に-20の冷凍庫内で緩急に凍結する。後日、RNA抽出用サンプル100~200mgをハンドホモジナイザーを用いてミキシングし、Guanidium-thiocyanate法にてtotal RNAを抽出する。脂肪組織における遺伝子発現としては、アディポネクチンとTNF- α , グルココルチコイドの活性化に作用する酵素である11 β -HSD-1, マクロファージの浸潤を誘導するMCP-1などのアディポネクチン分泌抑制因子をReal time-PCR法にて定量評価する。

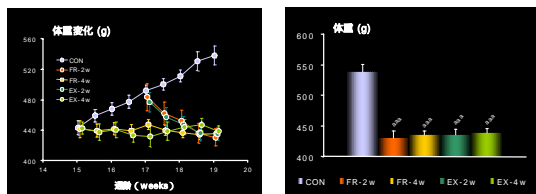
-20で凍結保存した脂肪組織は、10%ホルマリン緩衝液に2日間浸漬後、パラフィン包埋処理を行い、ミクロトームを用いて薄切片標本を作成する。作成した標本は、ヘマトキシリン-エオジンを用いた組織染色および抗マクロファージ抗体, 抗MCP-1抗体などを用いた免疫組織化学染色を行い、組織形態学的観察を行う。組織像はCCDカメラを用いてデジタル保存し、後日、NIH Imageを用いて脂肪細胞の大きさ(細胞径)を計測し、ヒストグラム解析を行う。

血液成分は、ELISA法を用いて血中のレプチンおよびアディポネクチン濃度, アディポネクチンの分泌を抑制している可能性のあるストレス指標のコルチコステロン濃度, 炎症性サイトカインのTNF- α 濃度, 先行研究において運動時のアディポネクチン分泌を抑制する可能性が報告されているテストステロン濃度を測定・評価する。また、血糖値(ムタローゼ・グルコースオキシダーゼ法)と遊離脂肪酸濃度(アシル-CoAシンターゼ・アシル-CoAオキシダーゼ法)を測定・評価する。

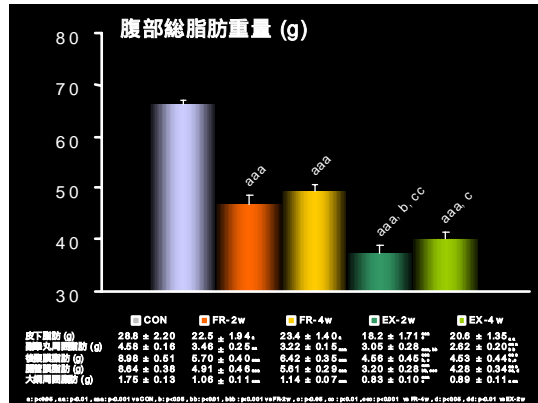
4. 研究成果

(1) 【運動療法は食事療法と比較して内臓脂肪重量を減少させる】

飼育期間中, CONT群の体重は成長に伴った増加が観察され, EX-2w群の体重は自発走運動によって開始時(17週齢)の体重から有意

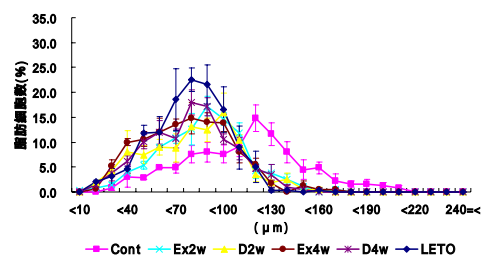
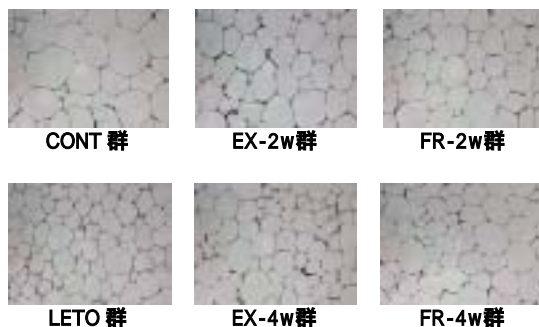


に減少した。また, EX-4w群の運動開始時(15週齢)の体重は, 目標体重であるLETOラットの19週齢時の体重と差が無かったことから, 開始時の体重を維持するように運動量を調節し, 2日に1回程度の自発走運動を行わせた。本研究の運動療法では, 19週齢時のCONT群の約85%までの体重減少に成功し, 全ての群においてCONT群との間に有意差が認められた。



腹部脂肪重量は, 運動療法によって顕著に減少し, EX-2w群およびEX-4w群ともCONT群と比較して有意差が観察されたが, 運動療法群における介入期間の間に差は認められなかった。また, 各部位の脂肪重量にも同様の傾向が観察された。一方, 後腹膜脂肪と皮下脂肪の組織標本における脂肪細胞サイズの比較では, ヒストグラムの左方変移が観察され, 運動療法によって脂肪細胞が小型化する傾向が観察された。

以上の結果から, 運動療法は食事療法と比較して, 同じ体重までの体重減少においても内臓脂肪を減少させる可能性が示唆された。



(2) 【短い期間で急速に体重を減少させる運

動プログラムよりも、長い期間でゆっくりと体重を減少させる運動プログラムにおいて、血中のアディポネクチン濃度を高値に維持できる】

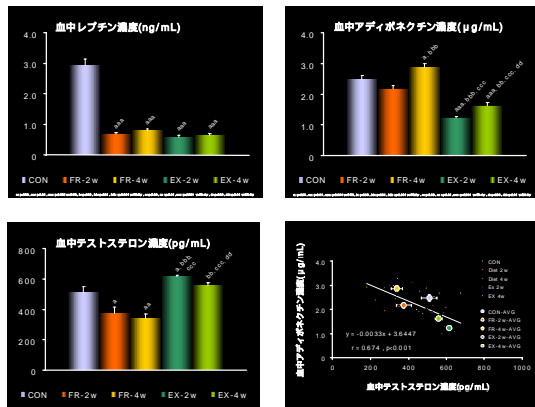
血中のレプチン濃度は、運動療法によって顕著に低下し、両介入期間とも CONT 群との間に有意差が認められたが、運動療法群における介入期間の違いに差はみられなかった。一方、血中のアディポネクチン濃度は両運動療法によって有意な低値が観察され、介入期間の違いにおける比較では EX-2w 群よりも EX-4w 群で有意な高値が観察された。

血中のコルチコステロン濃度は、運動療法によって高値となる傾向がみられ、CONT 群と比較して EX-4w 群で有意差が認められた。また血中のテストステロンおよびエストラジオール濃度は、運動療法によって高値となる傾向がみられたが、両運動療法群とも CONT 群との間に有意差は認められなかった。

以上の結果から、運動療法では短い期間で急速に体重を減少させる運動プログラムよりも、目標体重までの介入期間をより長く設定し、ゆっくりと長期間に渡って運動を継続するプログラムにおいて、血中のアディポネクチン濃度を高値に維持できる可能性が示唆された。

(3) 【血中のアディポネクチン濃度とテストステロン濃度の関係】

血中のアディポネクチン濃度はテストステロン濃度との間に負の相関関係がみられ、テストステロン濃度の上昇によってアディポネクチン濃度が低下する可能性が示唆された。



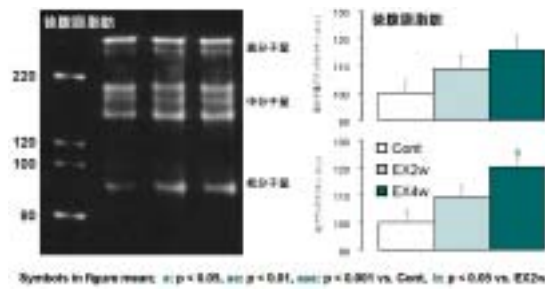
(4) 【脂肪組織中アディポネクチン濃度】

脂肪組織中のアディポネクチン濃度は、高分子量および総アディポネクチンとも運動によって増加傾向を示し、その傾向は EX-2w よりも EX-4w でより顕著であった。

(5) 【脂肪組織中のマクロファージ様細胞】

本研究では、運動療法および食事療法によって脂肪組織のパラフィン包埋切片上にお

いてマクロファージ様細胞が増加する様子は観察されなかった。



(6) 【研究成果のまとめ】

本研究の結果から、運動療法では短い期間で急速に体重を減少させる運動プログラムよりも、目標体重までの介入期間をより長く設定し、ゆっくりと長期間に渡って運動を継続するプログラムにおいて、血中のアディポネクチン濃度を高値に維持できる可能性が示唆された。

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1件)

Tomokazu Shinozaki, Masaki Kimura, Makoto Hosoyamada, Toshiaki Shibasaki (2008) Fluvoxamine inhibits weight gain and food intake in food restricted hyperphagic Wistar rats. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 31(2): 2250-2254. [査読あり]

〔学会発表〕(計19件)

Masaki Kimura, Negative legacy effects of obesity and western diet in young age, 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 2011.03.30, 神奈川県横浜市

木村真規, 南雲まい, 岩田紗弥, 滝上裕一, 細山田真, 齋藤英胤, 過食性肥満モデル OLETF ラットに対するアスタキサンチン投与の効果, 第 31 回日本肥満学会大会, 2010.10.2, 群馬県前橋市

南雲まい, 木村真規, 岩田紗弥, 滝上裕一, 細山田真, 齋藤英胤, 短期間の食事制限が血中および脂肪組織中のアディポサイトカイン濃度に及ぼす影響, 第 31 回日本肥満学会大会, 2010.10.1, 群馬県前橋市

木村真規, 篠崎智一, 山内秀樹, 鈴木政登, 柴崎敏昭, 運動療法が体重減少時のリバウンド期における脂肪細胞サイズと血中アディポネクチン濃度に及ぼす影響, 第 65 回日本体力医学会大会, 2010.9.18, 千葉県市川市

Masaki Kimura, Tomokazu Shinozaki, Yuichi Takiue, Makoto Hosoyamada,

Toshiaki Shibasaki , The effect of frequency and period of voluntary wheel running exercise on cellularity of adipocyte and secretion of adipocytokines in hyperphagic and obese OLETF rats. 15th Annual Congress of the European College of Sport Science , 2010.6.25 , Antalya, Turkey

木村真規, 岩田紗弥, 南雲まい, 篠崎智一, 滝上裕一, 山内秀樹, 鈴木政登, 細山田真, 柴崎敏昭, 食事療法が体重減少時のリバウンド期における血中アディポサイトカイン濃度に及ぼす影響, 第 30 回日本肥満学会大会, 2009.10.9, 静岡県浜松市

南雲まい, 木村真規, 岩田紗弥, 篠崎智一, 滝上裕一, 細山田真, 柴崎敏昭, 食事制限方法の違いが高脂肪食摂取後の脂肪細胞アポトーシスに及ぼす影響, 第 30 回日本肥満学会 2009.10.9, 静岡県浜松市

岩田紗弥, 木村真規, 南雲まい, 篠崎智一, 滝上裕一, 細山田真, 柴崎敏昭, OLETF および LETO ラットにおける血中レプチンおよびアディポネクチン濃度の成長に伴う経時的変化, 2009.10.9, 静岡県浜松市

木村真規, 篠崎智一, 山内秀樹, 鈴木政登, 柴崎敏昭, 運動療法が体重減少時のリバウンド期における脂肪細胞サイズと血中アディポネクチン濃度に及ぼす影響, 第 64 回日本体力医学会大会, 2009.9.19, 新潟県新潟市

Masaki Kimura , Appetite control and exercise -Approach using laboratory animals-, 第 17 回日本運動生理学会大会, 2009.7.25, 東京都港区

Masaki Kimura, Miyuki Machida, Tomokazu Shinozaki, Makoto Hosoyamada, Toshiaki Shibasaki , The cellularity of adipocyte and secretion of adipocytokines at the end of voluntary wheel running exercise and recovery period in hyperphagic and obese OLETF rats , 14th Annual Congress of the European College of Sport Science , 2009.6.25 , Oslo, Norway

篠崎智一, 木村真規, 日下部理英, 細山田真, 柴崎敏昭, 週齢差によるフルボキサミンの食欲抑制効果の比較. 第 82 回日本薬学会, 2009.3.26, 京都府京都市

木村真規, 宮麻依子, 篠崎智一, 日下部理英, 飯田麻祐子, 山内秀樹, 鈴木政登, 細山田真, 柴崎敏昭, 老齢 db/db マウスの糖・脂質代謝と肥大化脂肪細胞に対する PPAR アゴニスト投与の効果, 第 29 回日本肥満学会大会, 2008.10.17, 大分県大分市

篠崎智一, 木村真規, 日下部理英, 細山田真, 柴崎敏昭, 脳室内 Leptin 投与による視床下部セロトニンの変化, 第 29 回日本肥満学会, 2008.10.17, 大分県大分市

飯田麻祐子, 木村真規, 日下部理英, 篠

崎智一, 細山田真, 柴崎敏昭, 過度な食事制限が血中アディポネクチンおよびレプチンの濃度変化に及ぼす影響, 第 29 回日本肥満学会, 2008.10.17, 大分県大分市

日下部理英, 木村真規, 飯田麻祐子, 篠崎智一, 細山田真, 柴崎敏昭, 短期間の過度な食事制限が背側縫線核のセロトニンに及ぼす影響, 第 29 回日本肥満学会 2008.10.17, 大分県大分市

木村真規, 篠崎智一, 山内秀樹, 鈴木政登, 柴崎敏昭, 運動療法時の体重減少速度の違いが脂肪組織と血中アディポネクチンに及ぼす影響, 第 63 回日本体力医学会大会, 2008.9.18, 大分県大分市

篠崎智一, 木村真規, 柴崎敏昭, 脳内 Leptin 投与による視床下部セロトニンの変化, 第 63 回日本体力医学会大会 2008.9.18, 大分県大分市

Masaki Kimura, Miyuki Machida, Tomokazu Shinozaki, Makoto Hosoyamada, Toshiaki Shibasaki , Effects of frequency and duration of the voluntary wheel running exercise on cellularity of adipocyte and secretion of adipocytokines in hyperphagic and obese OLETF rats. 13th Annual Congress of the European College of Sport Science , 2008.7.10 , Estoril, Portugal

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 真規 (KIMURA MASAKI)
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号: 40383666

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

篠崎 智一 (SHINOZAKI TOMOKAZU)
慶應義塾大学・大学院薬学研究科・後期博士過程