

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：32610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650154

研究課題名（和文）運動は骨格筋筋芽細胞から褐色脂肪細胞への分化を誘導するか

研究課題名（英文）Can physical exercise induce differentiation from myoblasts to brown adipocytes ?

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（和文）：Myf 5 遺伝子を発現する骨格筋前駆細胞は、褐色脂肪細胞の前駆細胞でもあることが明らかとなり、褐色脂肪細胞は脱共役タンパク質-1 による熱産生を介したエネルギー消費能を有する事実から、褐色脂肪細胞をターゲットとした新たな抗肥満療法の確立が期待されている。運動は肥満の予防・治療法として汎用されてきたが、骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞化を誘導するかについてはよくわかっていなかった。我々は、C57BL/6J マウスに一過性の水泳運動を施すことによって、肩甲骨周囲骨格筋群では PRDM16 を中心とした褐色脂肪細胞化が誘導されることを観察し、運動は一部の骨格筋で褐色脂肪組織の形成を促すことを見出した。

研究成果の概要（英文）：Recently, there has been growing evidence that PRDM16 acts as a bidirectional switch to drive the differentiation of Myf-5-expressing mesenchymal stem cells into the brown adipocytes (BA). The aim of the current study was to test whether physical exercise modifies this differential event. Male C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups: the sedentary control group, the acute swimming group and the cold exposed group, a positive control of BA function. Several parts of skeletal muscles were used for analysis of both mRNA and protein which might be concerned with this event. Expression of mRNA for UCP-1, a specific marker of BA, was detected only in interscapular muscles in each group. Swimming group significantly increased PRDM16 mRNA and protein levels compared with control group. Moreover, levels of PRDM16 and C/EBP- β , which is a pivotal key regulator for switching of PRDM16, were significantly higher in swimming group than in control group. These results demonstrate that swimming exercise has powerful effects on differentiation event of Myf-5-expressed myoblasts into BA, thereby suggesting that swimming exercise is clinically useful as new anti-obesity treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：褐色脂肪細胞、水泳運動、UCP-1、PRDM16、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

従来、げっ歯類とは異なり、成人では退化しほとんど重要な役割を果たしていないと考えられていた褐色脂肪組織は、PET-CT 検査でがん組織と間違えられるほど多く存在し、エネルギー代謝と密接な関連を有することが明らかとなり、再び褐色脂肪組織が脚光を浴びるようになった。この報告とほぼ同時期に、myf 5 遺伝子を発現する骨格筋前駆細胞は褐色脂肪細胞へと分化することが明らかとなり、転写調節因子である PRDM16 を中心とした PPAR γ や C/EBP- β との複合体の作用による骨格筋細胞と褐色脂肪細胞への 2 方向性スイッチにより調節されることが報告された。これまで、持久的運動が 2 方向性スイッチの一方である myogenin の機能亢進を生じる報告はなされているが、PRDM16 による両スイッチへの修飾作用についてはまったくわかっていなかった。我々は、持久的運動によってアドレナリン作動薬に対する反応性が亢進することや、寒冷暴露による自然免疫能の低下の改善に持久的運動が有効であることなど、運動のもつ潜在能力について多くの科学的知見を提供してきた。最近では、持久的運動によって PPAR γ の転写調節機能が有意に亢進することを見出し、持久的運動は PPAR γ や PRDM16 を介した骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化を誘導する可能性があるかと仮定した。

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞は脱共役タンパク質 1 (UCP-1) の作用を介して熱産生を促進し、抗肥満の重要な調節機構としての一役を担っている。運動はさまざまな細胞に生理・生化学的な適応変化を引き起こすことから、PRDM16 によるスイッチオン・オフを誘導し、骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化を修飾する可能性が推察される。運動によって骨格筋前駆細胞が骨格筋細胞と褐色脂肪細胞のどちらに優位に分化するのかを知ることは、運動による適応や肥満の運動療法を考える上でまったく新しい視点からの情報を得られる可能性があり、PRDM16 の発現を誘導する肥満治療薬の開発に結びつくことが期待される。本研究では、運動は骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への運命決定を調節できるのか、という仮説を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

8 週齢の C57BL/6J マウスを非運動群、水泳運動群 (水温 35°C)、褐色脂肪組織活性化のポジティブコントロールである寒冷曝露群の 3 群にわけ、腓腹筋、ヒラメ筋、長拇指伸筋、肩甲骨周囲骨格筋、腹筋、背筋をサン

プリングし total RNA を調製後、DNA アレイ解析や RT-PCR 解析を行った。サンプルの一部より調製されたライセートを用いて、タンパク質発現や免疫沈降解析などを行った。

4. 研究成果

下肢や体幹、褐色脂肪組織の下部に存在する肩甲骨周囲骨格筋における褐色脂肪細胞化を検討したところ、褐色脂肪細胞のマーカである UCP-1 の mRNA は、水泳運動群の僧帽筋・棘下筋 (肩甲骨周囲骨格筋群) のみに発現することを見出した (図 1)。この状況下

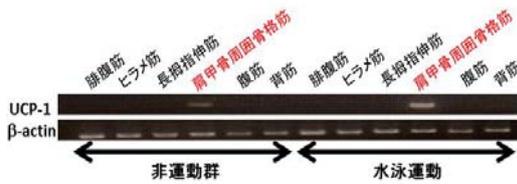


図1 水泳運動は、肩甲骨周囲骨格筋群におけるUCP-1 (褐色脂肪細胞のマーカ)の mRNA発現を促す

では、骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化を促す PRDM16 の mRNA とタンパク質の発現も有意に増加した (図 2)。PRDM16 機能の

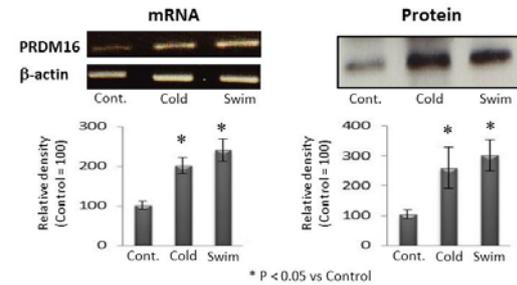


図2 水泳運動は、肩甲骨周囲骨格筋群におけるPRDM16 のmRNAとタンパク質の発現を促す

補助因子である C/EBP- β や PGC1- α 、PPAR γ の mRNA 発現も有意に増加し (図 3)、PRDM16 の活性化に必須な C/EBP- β と PRDM16 との結

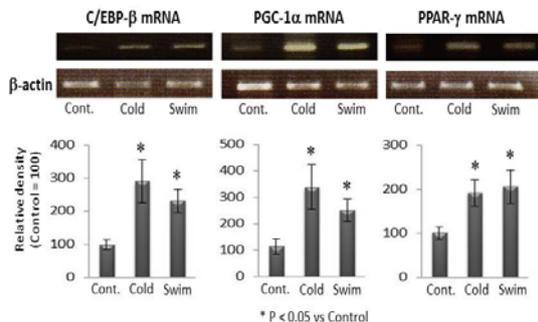


図3 水泳運動は、肩甲骨周囲骨格筋群におけるC/EBP- β 、PGC1- α 、PPAR- γ の mRNA発現を促す

合も有意に増加した (図 4)。DNA アレイ解析の結果、寒冷曝露群と水泳運動群では脂肪酸の酸化刺激により発現が増加する Elovl3 や褐色脂肪細胞の熱産生機能に關与する

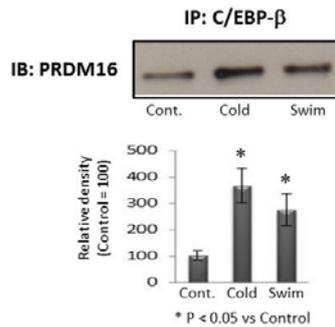


図4 水泳運動により肩甲骨周囲骨格筋群におけるPRDM16とC/EBP-βとの結合は増加する

Mfsd2a などの一部の遺伝子の発現が同様に増加することが明らかとなったが、褐色脂肪細胞化の誘導因子である BMP7 mRNA の発現は、水泳運動群のみ有意に増加した (表 1)。そこで、血中や肩甲骨周囲骨格筋組織における

表1 DNAアレイ解析による肩甲骨周囲骨格筋群における BMPファミリーの発現変化

	非運動群	寒冷曝露群	水泳運動群
BMP3	1	2.32(倍増)	2.03 (倍増)
BMP7	1	—	2.11 (倍増)

— : 非運動群に対して有意な発現変化なし

BMP7 の発現量について検討すると、血中の分泌型 BMP7 の発現量は水泳運動群で有意に増加した (図 5)。運動による骨格筋の収縮は、褐色脂肪細胞様細胞の形成に寄与するマイオカインの分泌を促す。そのため、骨格筋の

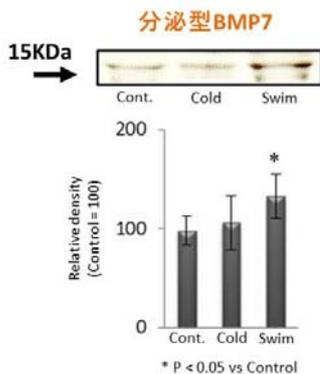


図5 水泳運動によって血中の分泌型BMP7は増加する

収縮マーカーである P38MAPK の活性化について検討したところ、水泳運動群における肩甲骨周囲骨格筋群では活性化は認められず、むしろ非運動群と比べて有意に低下することが観察された。

水泳運動は肩甲骨周囲骨格筋群の褐色脂肪細胞化を促すことが示唆され、「運動は骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への運命決定を調節できるのか」という仮説は、肩甲骨周囲骨格筋群に適応することが明らかとなった。

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 32 件)

- (1) Sakurai, T., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Ogasawara, J., Kizaki, T., Sato, S., Fujiwara, T., Akagawa, K., Izawa, T. & Ohno, H. : Oligomerised lychee fruit-derived polyphenol attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mice and endoplasmic reticulum stress in neuronal cells. *Br. J. Nutr.* 109, in press, 2013, 査読有
- (2) Sakurai, T., Kashimura, O., Kano, Y., Ohno, H., Li Li Ji, Izawa, T. & Best, Thomas M. : Role of nitric oxide in muscle regeneration following eccentric muscle contractions in rat skeletal muscle. *J. Physiol. Sci.* 63, in press, 2013, 査読有
DOI : 10.1007/s12576-013-0262-y
- (3) Takahashi, K., Miyokawa-Gorin, K., Handa, K., Kitahara, A., Moriya, R., Onuma, H., Sumitani, Y., Tanaka, T., Katsuta, H., Nishida, S., Ohno, H. & Ishida, H. : Endogenous oxidative stress induces hypoxia-independent VEGF120 release via PI3K-dependent pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity* 21, in press, 2013, 査読有
- (4) Sato, S., Shirato, K., Mitsuhashi, R., Inoue, D., Kizaki, T., Ohno, H., Tachiyashiki, K. & Imaizumi, K. : Intracellular β 2-adrenergic receptor signaling specificity in mouse skeletal muscle in response to single-dose β 2-agonist clenbuterol treatment and acute exercise. *J. Physiol. Sci.* 63 : 211-218, 2013, 査読有
DOI : 10.1007/s12576-013-0253-z
- (5) Radák, Z., Koltai, E., Taylor, AW., Higuchi, M., Kumagai, S., Ohno, H., Goto, S. & Boldogh, I. : Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 58 : 87-97, 2013, 査読有
DOI : 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.004
- (6) Radák, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H. & Atalay, M. : Oxygen consumption and usage during physical exercise: The balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal.* 18 : 1208-1246, 2013, 査読有

- DOI :10.1089/ars.2011.4498
- (7) Ogasawara, J., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Sakurai, T., Kizaki, T., Izawa, T., Ishida, H. & Ohno, H. : Oligonol-induced degradation of perilipin 1 is regulated through lysosomal degradation machinery. *Nat. Prod. Commun.* 7 : 1193-1196, 2012, 査読有
- (8) Ogasawara, J., Sakurai, T., Kizaki, T., Ishibashi, Y., Izawa, T., Sumitani, Y., Ishida, H., Radák, Z., Haga, S. & Ohno, H. : Higher levels of ATGL are associated with exercise-induced enhancement of lipolysis in rat epididymal adipocytes. *PLoS One* 7 : e40876, 2012, 査読有
DOI : 10.1371/journal.pone.0040876
- (9) Izawa, T., Ogasawara, J., Sakurai, T., Nomura, S., Kizaki, T. & Ohno, H. : Recent advances in the adaptations of adipose tissue to physical activity : Morphology and adipose tissue cellularity. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 : 381-387, 2012, 査読有
- (10) 内藤祐二郎、長澤純一、杉山康司、笹尾真美、野口いづみ、佐藤章悟、石橋義永、木崎節子、大野秀樹 : 登山に対する電気伝導率を利用した疲労評価. *登山医学* 32 : 148-154, 2012, 査読有
- (11) Ohno, H., Shirato, K., Sakurai, T., Ogasawara, J., Sumitani, Y., Sato, S., Imaizumi, K., Ishida, H. & Kizaki, T. : Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 : 5-16, 2012, 査読有
- (12) Arai, T., Oh-Ishi, T., Yamamoto, H., Nunoi, H., Kamizono, J., Uehara, M., Kubota, T., Sakurai, T., Kizaki, T. & Ohno, H. : Copy number variations due to large genomic deletion in x-linked chronic granulomatous disease. *PLoS One* 7 : e27782, 2012, 査読有
DOI : 10.1371/journal.pone.0027782
- (13) Sakurai, T., Ogasawara, J., Kizaki, T., Ishibashi, Y., Sumitani, Y., Takahashi, K., Ishida, H., Miyazaki, H., Saitoh, D., Haga, S., Izawa, T. & Ohno, H. : Preventive and improvement effects of exercise training and supplement intake in white adipose tissues on obesity and lifestyle-related diseases. *Environ. Health Prev. Med.* 17 : 348-356, 2012, 査読有
DOI : 10.1007/s12199-012-0271-0
- (14) Kizaki, T., Sato, S., Sakurai, T., Ogasawara, J., Imaizumi, K., Izawa, T., Nagasawa, J., Saitoh, D., Haga, S. & Ohno, H. : The effects of exercise on macrophage function. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 : 113-124, 2012, 査読有
- (15) Sakurai, T., Ogasawara, J., Kizaki, T., Ishibashi, Y., Fujiwara, T., Akagawa, K., Izawa, T., Radák, Z. & Ohno, H. : Exercise training and the promotion of neurogenesis and neurite outgrowth in the hippocampus. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 : 333-338, 2012, 査読有
- (16) Ogasawara, J., Sakurai, T., Kizaki, T., Takahashi, K., Sumitani, Y., Ishida, H., Izawa, T., Toshinai, K., Nakano, N. & Ohno, H. : Effect of physical exercise on lipolysis in white adipocytes. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 : 351-356, 2012, 査読有
- (17) Sato, S., Shirato, K., Kizaki, T., Ohno, H., Tachiyashiki, K. & Imaizumi, K. : Effects of $\beta 2$ - agonists and exercise on $\beta 2$ - adrenergic receptor signaling in skeletal muscles. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 : 139-144, 2012, 査読有
- (18) Shirato, K., Kizaki, T., Ohno, H. & Imaizumi, K. : Effects of exercise on the hexosamine biosynthetic pathway and glycosylation. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 : 145-150, 2012, 査読有
- (19) Miyokawa-Gorin, K., Takahashi, K., Handa, K., Kitahara, A., Sumitani, Y., Katsuta, H., Tanaka, T., Nishida, S., Yoshimoto, K., Ohno, H. & Ishida, H. : Induction of mitochondrial uncoupling enhances VEGF (120) but reduces MCP-1 release in mature 3T3-L1 adipocytes: Possible regulatory mechanism through endogenous ER stress and AMPK-related pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419 : 200-205, 2012, 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.01.145
- (20) Honmyo, R., Kokaze, A., Karita, K., Yoshida, M., Ishikawa, M. & Ohno, H. : Influence of mitochondrial DNA 5178 C/A polymorphism on serum cholesterol changes : a short-term follow-up in middle-aged Japanese men. *Environ. Health Prev. Med.* 17 : 401-407, 2012, 査読有
DOI : 10.1007/s12199-012-0268-8
- (21) Son, HJ., Kim, HJ., Kim, JH., Ohno, H. & Kim, CK. : Erythropoietin, 2,3 DPG, oxygen transport capacity, and

- altitude training in adolescent Alpine skiers. *Aviat. Space Environ. Med.* 83 : 50-53, 2012, 査読有
- (22) Sakurai, T., Ogasawara, J., Kizaki, T., Ishibashi, Y., Fujiwara, T., Akagawa, K., Izawa, T., Oh-ishi, S., Haga, S. & Ohno, H. : Involvement of leucine zipper transcription factor-like protein 1 (Lztf11) in the attenuation of cognitive impairment by exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416 : 125-129, 2011, 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2011.11.008
- (23) Kizaki, T., Maegawa, T., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ookawara, T., Oh-ishi, S., Izawa, T., Haga, S., & Ohno, H. : Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413 : 454-459, 2011, 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2011.08.117
- (24) Miyazaki, H., Kinoshita, M., Ono, S., Nakashima, M., Hara, E., Ohno, H., Seki, S. & Saitoh, D. : Augmented bacterial elimination by Kupffer cells after IL-18 pretreatment via IFN- γ produced from NK cells in burn-injured mice. *Burns* 37 : 1208-1215, 2011, 査読有
DOI : 10.1016/j.burns.2011.04.010
- (25) 長澤純一、内藤祐二郎、杉山康司、笹尾真美、曾我部健、新美敬太、野口いづみ、芳賀脩光、石橋義永、木崎節子、大野秀樹 : 富士登山時の自律神経応答と身体の電気伝導率. *登山医学* 31:145-152, 2011, 査読有
- (26) 笹尾真美、野口いづみ、新美敬太、曾我部健、井出正道、高野宏二、杉山康司、長澤純一、大野秀樹 : 高度が味覚感度へ及ぼす影響—富士山における味覚定性定量検査—. *登山医学* 31:127-131, 2011, 査読有
- (27) Hatano, D., Ogasawara, J., Endoh, S., Sakurai, T., Nomura, S., Kizaki, T., Ohno, H., Komabayashi, T. & Izawa, T. : Effect of exercise training on the density of endothelial cells in the white adipose tissue of rats. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 21 : e115-e121, 2011, 査読有
DOI : 10.1111/j.1600-0838.2010.01176.x
- (28) Ogasawara, J., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Sakurai, T., Kizaki, T., Izawa, T., Ishida, H. & Ohno, H. : Comparison of the effect of oligonol, a new lychee fruit-derived low molecular form of polyphenol, and epigallocatechin-3-gallate on lipolysis in rat primary adipocytes. *Phytother Res.* 25 : 467-471, 2011, 査読有
DOI : 10.1002/ptr.3296.
- (29) Ogasawara, J., Nomura, S., Rahman, N., Sakurai, T., Kizaki, T., Izawa, T., Ishida, H., Haga, S. & Ohno, H. : Hormone-sensitive lipase is critical mediators of acute exercise-induced regulation of lipolysis in rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400 : 134-139, 2010, 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2010.08.026
- (30) Ogasawara, J., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Sakurai, T., Kizaki, T., Izawa, T., Ishida, H., Tanno, M. & Ohno, H. : Oligonol, an oligomerized lychee fruit-derived polyphenol, activates the Ras/Raf-1/MEK1/2 cascade independent of the IL-6 signaling pathway in rat primary adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402 : 554-559, 2010, 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2010.10.082
- (31) Sakurai, T., Endo, S., Hatano, D., Ogasawara, J., Kizaki, T., Oh-ishi, S., Izawa, T., Ishida, H. & Ohno, H. : Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. *Acta Physiol (Oxf)*. 200 : 325-338, 2010, 査読有
DOI : 10.1111/j.1748-1708.2010.02159.x
- (32) 長澤純一、杉山康塚、内丸仁、笹尾真美、高野宏二、野口いづみ、鈴木康弘、北舘健太郎、芳賀脩光、前川剛輝、櫻井拓也、小笠原準悦、木崎節子、大野秀樹 : 低圧・低酸素環境が引き起こす酸化ストレスとオリゴノールの抗酸化効果. *登山医学* 30 : 118-124, 2010, 査読有

[学会発表] (計 39 件)

- (1) 小笠原準悦ほか : 水泳運動により誘導される肩甲骨周囲骨格筋群の褐色脂肪細胞化の検討. 第 83 回日本衛生学会学術総会、金沢、2013 年 3 月 25 日.
- (2) 小笠原準悦ほか (招待講演) : 運動するとなぜ痩せる? ~白色脂肪細胞ではいったい何がおこるのか~. 第 14 回日本体力医学会北海道地方会、札幌、2012 年 6 月 17 日.
- (3) 小笠原準悦ほか : 水泳運動は骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化シグナル

を促進する。第82回日本衛生学会学術総会、京都、2012年3月25日。

- (4) 小笠原準悦ほか：骨格筋から褐色脂肪細胞への分化機構に及ぼす寒冷曝露と水泳運動の効果。第66回日本体力医学会大会、下関、2011年9月17日。
- (5) Ogasawara, J. et al.: The lipolytic activity in adipocytes differs between normal and high fat diet mice via changes in the trafficking of $\beta 2$ -adrenergic receptor. 第88回日本生理学会大会、横浜、2011年3月30日。
- (6) Ogasawara, J. et al.: Oligonol, a new lychee fruit-derived low molecular form of polyphenol, enhances lipolysis in primary rat adipocytes via activation of the ERK1/2 pathway. 11th International Congress on Obesity, Stockholm (Sweden), July 13, 2010.
- 他 33 件

[図書] (計9件)

- (1) 大野秀樹ほか：機能性食品素材と運動療法－生活習慣病予防と運動機能維持向上を目指して－、シーエムシー出版、2012、p.177-184。
- (2) 大野秀樹ほか：からだと温度の事典、朝倉書店、2010、p.516-517。

他 7 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]

なし

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
小笠原 準悦 (OGASAWARA JYUNETSU)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：20415110

櫻井 拓也 (SAKURAI TAKUYA)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：20353477

木崎 節子 (KIZAKI TAKAKO)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：00322446