

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月2日現在

機関番号：34310
研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2011～2013
課題番号：23300242
研究課題名 (和文) 脂肪細胞の時計遺伝子リズムにもとづく運動処方最適タイミング：
時間運動療法の意義
研究課題名 (英文) Exercise prescription based on the circadian rhythm of adipocyte
clock genes: The significance of chrono-exercise prescription

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) 14,900,000 円、(間接経費) 4,470,000 円

研究成果の概要 (和文)：

ラット脂肪細胞のアディポカインならびにエネルギー代謝調節分子群の mRNA 発現レベルは脂肪細胞の時計遺伝子発現リズムと強く相関していた。脂肪細胞の時計遺伝子 (Bmal1 遺伝子) 発現のピーク時またはボトム時に運動を課したところ、運動後の脂肪細胞の代謝調節分子やアディポカインの遺伝子発現は前者と後者で異なっていた。さらに、メラトニンがアディポカインや代謝調節分子群の mRNA 発現に影響を与えることも明らかとなった。以上の知見は、肥満の予防改善のための運動は脂肪細胞の時計遺伝子発現リズムを考慮したタイミングで実施すべきことを示している。

研究成果の概要 (英文)：

The mRNA levels of both adipokines and metabolic genes were strongly correlated with those of clock genes. The mRNA expressions of adipokines and metabolic genes, which were obtained after the exercise performed at the peak of Bmal1 mRNA expression, differed from those obtained after the exercise performed at the bottom of Bmal1 mRNA expression. Melatonin affected the mRNA expressions of several genes regulating adipocyte metabolism and adipokines. The findings indicate that the circadian rhythm of adipokines genes and metabolic genes should be considered when the exercise is used for preventing and improving metabolic syndrome due to obesity.

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：脂肪細胞、時計遺伝子、運動、アディポカイン、脂肪分解反応

1. 研究開始当初の背景

肥満を基盤とした生活習慣病は脂肪組織のアディポカインの分泌異常と代謝異常に深い関係がある。運動は生活習慣病の予防改善手段として定着している。しかし、運動の効果について必ずしも統一された結果が得られているとは言えない。たとえばアディポネクチンレベルに及ぼす運動の効果は、「減少」、「増加」、「不変」の三様の報告がある。このような矛盾を起こす要因として、運動の強度や持続時間が研究者間で異なっていることが指摘されている。また、運動の強度や持続時間の違いだけではなく、

運動を実施するタイミングが研究 (者) によって異なっていることも、結果の矛盾を引き起こす大きな原因となっている可能性がある。実際、食事と運動のタイミングを変えると、脂肪分解と脂肪合成を調節する分子群の遺伝子発現も異なってくることや、運動トレーニングによる脂肪分解反応も運動実施時刻が異なると、その増強効果も変化する (井澤ら、未発表データ)。すなわち運動実施のタイミングにはベストな時点が存在していると考えられる。

最近、中枢以外のさまざまな細胞で時計遺伝子が発見され、脂肪細胞においては、

時計遺伝子 *Clock*、*Bmal1* がアディポカインや代謝調節因子とフィードバックループによるネットワークを形成し、時計遺伝子の disruption がメタボリックシンドロームに繋がるとするデータが増えつつある。つまり、脂肪細胞の代謝やアディポカインに日内変動があって、それらが時計分子群の修飾を受けるとすると、肥満を基盤とした生活習慣病の予防・改善を目的とする運動療法は脂肪細胞自身の概日リズムをも背景として設計すべきである。

2. 研究の目的

以上の学術的背景を踏まえ、脂肪細胞における時計遺伝子の発現リズムとアディポカインならびに代謝調節因子群の遺伝子発現リズムの関係を明らかにし、肥満（糖尿病）改善を目的とする運動処方最適な実施タイミングの同定を目的として一連の研究を行った。運動は生活習慣病の予防・治療に重要なツールであり、運動処方の最適な実施タイミングを分子レベルで明らかにすることは、肥満に伴う生活習慣病の新規運動療法の開発に大きく寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ラット脂肪細胞における時計遺伝子の日内変動と代謝調節関連遺伝子との関係

実験動物は 12 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。時計遺伝子と出力遺伝子の発現プロファイルの収集を目的として、明暗サイクル条件の点灯時刻を Zeitgeber Time (ZT)12 と定め、精巣上体脂肪組織のサンプリングを ZT12 から 3 時間ごとに 8 点で行い、時計遺伝子群ならびに代謝調節関連遺伝子群の mRNA 発現を real-time PCR によって測定した。

(2) 時計遺伝子発現リズムに合わせた一過性運動の影響

実験動物は 12 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。上記実験で確認した時計遺伝子 (*Bmal1*) mRNA 発現のピークまたはボトム時の ZT 時刻に、速度 20m/min のトレッドミル運動を 30 分間、ラットに課した。運動終了直後ならびに 12 時間後、24 時間後にアディポカインと代謝調節因子群の mRNA 発現を real-time PCR で測定した。

(3) 時計遺伝子群と代謝調節関連因子群の mRNA 発現に及ぼすメラトニンの影響

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を分化誘導し、分化誘導開始 4 日目と 8 日目に実験を実施した。時計遺伝子リズムは serum shock をかけることで同調させた。*Bmal1* と *Per2* の

mRNA 発現、およびアディポカインや代謝調節関連因子群の mRNA 発現は serum shock 後 3 時間ごとに real-time PCR で測定した。

(4) 時計遺伝子発現の可視化

3T3L1 細胞において、発光色の異なる 2 種のルシフェラーゼ (*luc*) 遺伝子をレポーターとしたマルチカラー *luc* アッセイを行った。*Per2*-RED レポーターベクターならびに *Bmal1*-PTGR レポーターベクター（産業総合研究所より譲渡）を一過性に 3T3L1 細胞に遺伝子導入し、時計遺伝子リズム発現を測定した。

4. 研究成果

(1) ラット脂肪細胞における時計遺伝子の日内変動と代謝調節関連遺伝子との関係

ラット (Wistar 系、雄性、12 週齢) の精巣上体脂肪組織において、*Bmal1* 遺伝子と *Per2* 遺伝子において日周リズムの確認ができた (図 1)。また、腸間膜脂肪組織ならびに鼠蹊部皮下脂肪組織においても同様の傾向が確認できた。さらに、精巣上体脂肪組織の時計遺伝子と出力遺伝子の同調性について検討した。その結果、*Per2* 遺伝子とペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 γ (*Ppar γ*) 遺伝子、*Clock* 遺伝子と *Ppar γ* コアクチベーター α (*Pgc1- α*) 遺伝子に有意な正の相関関係が認められ、*Bmal1* 遺伝子とレプチン遺伝子に有意な負の相関関係が認められた。

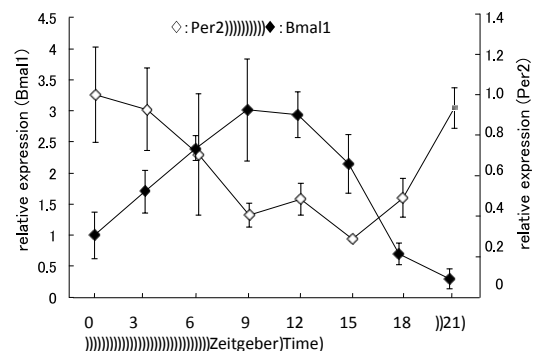


図 1. ラット精巣上体脂肪組織における *Bmal1* 遺伝子と *Per2* 遺伝子の日内変動

(2) 時計遺伝子発現リズムに合わせた一過性運動の影響

実験動物はラット (Wistar 系、雄性、12 週齢) を用いた。上記実験で確認した時計遺伝子 (*Bmal1*) mRNA 発現のピークまたはボトム時の ZT 時刻に 30 分間、20m/min のトレッドミル運動をラットに課した。運動終了後の *Bmal1* mRNA 発現のピーク時およびボトム時のレプチン mRNA 発現を real-time

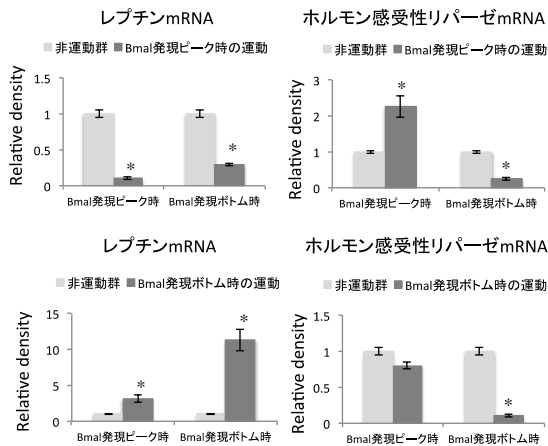


図 2. ラット精巣上体脂肪組織の *Bmal1* 遺伝子発現のピーク時またはボトム時に行なった運動の影響。P<0.05 vs 非運動群

PCR で測定した結果、*Bmal1* mRNA 発現のピーク時に行なった運動は、運動終了後のレプチン mRNA 発現を低下させ、*Bmal1* mRNA 発現のボトム時に行なった運動は、運動終了後のレプチン mRNA 発現を低下させた (図 2)。

さらに、脂肪分解反応を調節するホルモン感受性-リパーゼの mRNA 発現について検討した。その結果、*Bmal1* mRNA 発現ピーク時のホルモン感受性リパーゼ mRNA 発現が *Bmal1* mRNA 発現のピーク時に行なった運動によって増加した。しかし、*Bmal1* mRNA 発現のボトム時のホルモン感受性リパーゼ mRNA 発現は運動のタイミングに関わらず低下していた。

(3) 時計遺伝子群と代謝調節関連因子群の mRNA 発現に及ぼすメラトニンの影響

時計遺伝子発現リズムを制御する内在性の因子としてメラトニンに着目し、時計遺伝子群と代謝調節関連分子群の mRNA 発現に及ぼすメラトニンの影響について *in vitro* で検討した。マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を分化誘導し、分化誘導開始 4 日目と 8 日目に実験を実施した。*Bmal1* と *Per2* の明瞭な発現リズムは serum shock 8 時間後からおよそ 48 時間後までみられた (図 3)。

図 4 はメラトニンの様々な遺伝子発現に及ぼす影響を示したものである。メラトニン存在下では *Bmal1* のピーク時の mRNA 発現が高くなる傾向にあった (P=0.06)。また、メラトニンによってアディポネクチンと *PPAR* γ の mRNA 発現は有意に大きくなった。これに対して、単球走化性促進因子 (MCP) 1 とレ

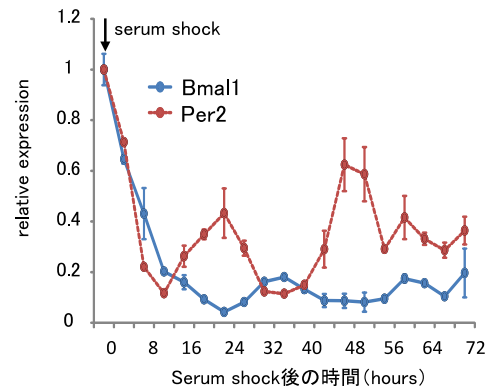


図 3. Serum shock による 3T3-L1 細胞の *Bmal1* 遺伝子と *Per2* 遺伝子の発現リズム

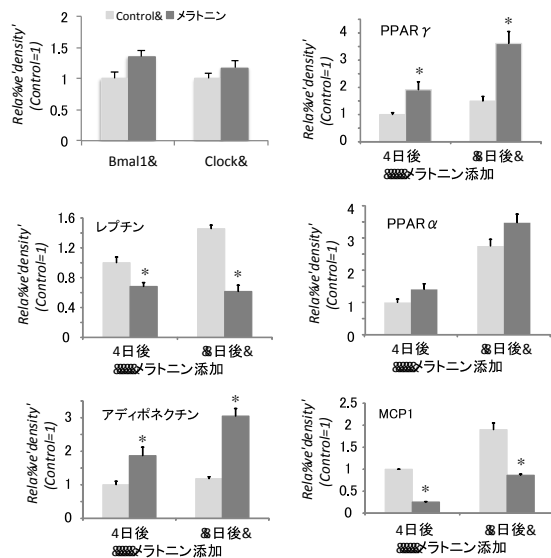


図 4. 3T3-L1 細胞におけるメラトニンの様々な遺伝子発現に及ぼす影響。P<0.05 vs control

プチンの mRNA 発現はメラトニンによって有意に低下した。メラトニン添加によって細胞増殖が盛んになり小型の細胞が増えていたが、これは、*PPAR* γ の mRNA 発現増加と関係しているのかもしれない。

(4) 時計遺伝子発現の可視化

3T3L1 細胞において、発光色の異なる 2 種のルシフェラーゼ (*luc*) 遺伝子をレポーターとしたマルチカラー *luc* アッセイを行い、*Bmal1* 遺伝子と *Per2* 遺伝子の明瞭な日周期のリズムを検討した。その結果、4 時間周期の正弦波との相関係数に有意な関係がみられた。

5. 主な論文発表等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Ogasawara J, Ito T, Wakame K, Kitadate K, Sakurai T, Sato S, Ishibashi Y, Izawa T, Takahashi K, Ishida H, Takabatake I, Kizaki T, Ohno H. ETAS, an enzyme-treated asparagus extract, attenuates amyloid beta-induced cellular disorder in PC12 cells. *Nat Prod Commun.*, 9: 561-564, 2014, 査読有
- ② 井澤鉄也、脂肪分解反応を制御する新しいプレーヤーと運動の影響 (総説)、医学のあゆみ、244: 1068-1073、2013、査読無
- ③ Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Ishibashi Y, Takahashi M, Kobayashi O, Oh-Ishi S, Nagasawa J, Takahashi K, Ishida H, Izawa T, Ohno H. The Effects of Exercise Training on Obesity-Induced Dysregulated Expression of Adipokines in White Adipose Tissue. *Int J Endocrinol.* 2013:801743, 2013, 査読有
- ④ Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Takahashi M, Izawa T, Imaizumi K, Taniguchi N, Ohno H, Kizaki T. A circadian clock gene, *Rev-erba*, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of *Ccl2* expression. *J Immunol.*, 192: 407-417, 2014, 査読有
- ⑤ Sakurai T, Kashimura O, Kano Y, Ohno H, Ji LL, Izawa T, Best TM. Role of nitric oxide in muscle regeneration following eccentric muscle contractions in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci.*, 63: 263-270, 2013, 査読有
- ⑥ 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.*, 110: 1549-1558, 2013, 査読有
- 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, Radak 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
- ⑨ 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
- ⑩ Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T, Takahashi K, Ishida H, Izawa T, Toshinai K, Nakano N, Ohno H. Effect of physical exercise on lipolysis in white adipocytes. *J Phys Fitness Sports Med.*, 1: 351-356, 2012, 査読無
- ⑪ Kizaki T, Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Imaizumi K, Izawa T, Nagasawa J, Saitoh D, Haga S, Ohno H. Effects of exercise on macrophage functions. *J Phys Fitness Sports Med.*, 1: 113-124, 2012, 査読無
- ⑫ 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 Fitness Sports Med.*, 1: 381-387, 2012, 査読無
- ⑬ 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 (*Lztl1*) in the attenuation of cognitive impairment by exercise training. *Biochem Biophys Res Commun.*, 416: 125-129, 2011, 査読有
- ⑭ Kizaki T, Maegawa T, Sakurai T, Ogasawara JE, 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
- ⑮ 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
- ⑯ 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

[学会発表] (計12件)

- ① 小笠原準悦、櫻井拓也、佐藤章悟、石橋義水、長澤純一、大石修司、芳賀脩光、井澤鉄也、木崎節子、大野秀樹：持久性走トレーニングによる白色脂肪細胞の脂肪分解反

- 応の亢進にはATGLの発現変化が関与する。第158回日本体力医学会関東地方会，東京（2013. 7）
- ② Junetsu Ogasawara, Tomohiro Ito, Jun Takanari, Takuya Sakurai, Shogo Sato, Yoshinaga Ishibashi, Junichi Nagasawa, Daizo Saito, Norihiko Nakano, Tetsuya Izawa, Hideki Ohno : Inhibitory effect of ETAS against amyloid beta-induced cellular disorder in PC12 cells. International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, Sapporo. (2013. 7)
- ③ 佐藤章悟、木崎節子、櫻井拓也、小笠原準悦、石橋義永、長澤純一、桜井智野風、井澤鉄也、今泉和彦、芳賀脩光、大野秀樹：時計遺伝子Rev-erb α はMCP1遺伝子の発現を抑制しマクロファージ免疫機能を制御する、第68回日本体力医学会、東京（2013. 9）
- ④ 小笠原準悦、櫻井拓也、木崎節子、佐藤章悟、石橋義永、井澤鉄也、宮崎裕美、齋藤大蔵、十枝内厚次、大石修司、芳賀脩光、大野秀樹水泳運動は前駆細胞からの褐色脂肪細胞化を促す、第68回日本体力医学会、東京（2013. 9）
- ⑤ 加藤久詞、増田慎也、高倉久志、佐藤章悟、小笠原準悦、櫻井拓也、木崎節子、桜井智野風、大野秀樹、井澤鉄也：脂肪組織および骨格筋組織における時計遺伝子と脂質代謝関連遺伝子の関連性 第68回日本体力医学会、東京（2013. 9）
- ⑥ 櫻井拓也、北舘健太郎、西岡浩、若命浩二、藤井創、小笠原準悦、木崎節子、佐藤章吾、石橋義永、今泉和彦、齋藤大蔵、井澤鉄也、大野秀樹：アスパラガス茎抽出物は神経細胞の熱ショックタンパク質発現を誘導し、細胞障害を減弱させる。第20回総合医療機能性食品国際会議，札幌（2012. 7）
- ⑦ 小笠原準悦、櫻井拓也、木崎節子、佐藤章吾、井澤鉄也、芳賀脩光、今泉和彦、大石修司、大野秀樹：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67回日本体力医学会，岐阜（2012. 9）
- ⑧ 櫻井拓也、小笠原準悦、木崎節子、石橋義永、炭谷由計、井澤鉄也、石田均、鈴木健二、芳賀脩光、大野秀樹：運動は肥満による脂肪組織のデルマトポンチン発現増加を減弱させる。第82回日本衛生学会学術総会，京都大学（2012. 3）
- ⑨ Izawa T. : Effects of exercise-training-induced hormonal changes on body composition. The 6th International Conference on Nutrition and Aging, Tokyo, Japan. (2011. 9)
- ⑩ 小笠原準悦，北舘健太郎，西岡浩，藤井創，櫻井拓也，木崎節子，石橋義永，炭谷由計，石田均，井澤鉄也，大野秀樹：脂肪細胞の脂肪分解反応に及ぼす新規カテキン型ポリフェノール複合体Oligonolの効果，第21回体力・栄養・免疫学会大会（北里大学）（2011. 7）
- ⑪ 櫻井拓也，小笠原準悦，木崎節子，井澤鉄也，長澤純一，芳賀脩光，大野秀樹：運動は老化促進モデルマウスの認知機能障害を予防する，第18回日本運動生理学会（鹿児島大学）（2010. 7）
- ⑫ 小笠原準悦，櫻井拓也，木崎節子，石橋義永，炭谷由計，井澤鉄也，宮崎裕美，大石修司，芳賀脩光，大野秀樹：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，山口（2011. 9）

[図書]（計3件）

- ① 井澤鉄也、駒林隆夫（編集ならびに分担執筆）：脂肪組織のエクササイズバイオロジー、ナッパ、2011
- ② 井澤鉄也：運動トレーニングによるホルモン変化とボディコンポジションの変化、In : ILSI Japan、110号、pp.93-pp.103、2012
- ③ 井澤鉄也（分担執筆）：ここまでわかった燃える褐色脂肪の不思議、pp. 30-49、pp. 78-79、ナッパ、2013

6. 研究組織

- (1) 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
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし