

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500849

研究課題名(和文) 脂質異常症の予防と治療のための短期軽度カロリー制限と運動処方の分子メカニズム

研究課題名(英文) Preventive effects and molecular mechanisms for metabolic abnormalities by a short-term intervention of caloric restriction and exercise

研究代表者

澤下 仁子 (SAWASHITA, Jinko)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：40359732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、中高齢代謝異常マウスや加齢に伴う全身性疾患モデルマウスを用い、短期間の個別強度走行運動(HR)とカロリー制限(CR)による代謝改善効果や疾患制御効果を解析したものである。代謝異常や加齢マウスでは、HRとCRの併用は単独処方よりもさらに効率良く基礎代謝を改善可能なことを示唆し、疾患モデルに対しては病態の進行を軽症化した。疾患制御は、各処方が発症に伴って増加する炎症・ストレス応答を低減し、複合的に代謝改善することに依ると示唆され、これら処方が加齢に伴う代謝減退にも効果をもたらす可能性を示唆した。以上の成果から、これらの処方が中高年の健康増進意欲の向上に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study is a basic research that analyzed beneficial effects of metabolic improvement and a disease control in mice, which are middle-aged and older having metabolic abnormalities or which have a systemic disease with age, by short-term individual high-intensity running exercise (HR) and mild caloric restriction (CR). The combination of HR and CR might improve more efficiently in basal metabolism than each treatment, and both HR and CR improved in pathologic progress in mice having the age-associated disease. These treatments may prevent the progression of inflammation and stress reaction, and it suggests that HR and/or CR have good effects to age-related metabolic decline. These treatments suggest the possibility of contribution to health promotion to middle-aged and elder people.

研究分野：病態生化学、薬理学

キーワード：抗加齢 疾患モデルマウス 軽度負荷運動 軽度カロリー制限 代謝改善

1. 研究開始当初の背景

現代日本が抱える社会問題のひとつに、中高年の全身性疾患罹病者増に伴う医療費の莫大な増加が挙げられる。特に、脂質異常症は個人の生活習慣をみなおすことで高い改善効果が得られると考えられていることから、研究代表者等は、薬剤等の医療介入を用いず、安易に実施可能な健康増進処方提案することが必務と考えた。

これまで、研究代表者らは、日本人の軽-中度の肥満中高年に対し、軽度カロリー制限 (Caloric restriction, CR) とインターバル速歩運動 (High-intensity interval walking, HW) を 16 週間実施し、運動のみ (HW) よりも併用 (CR+HW) の方が効率良く肥満を軽快化し、高血圧、空腹時血糖値や血中脂質レベルも改善させることに成功している¹⁾(図1左)。さらに、この介入期間を含む6ヶ月間の一般診療医療費が激減することも明らかにし(図1右)、研究代表者らが設計した食餌・運動処方は脂質異常症の軽快化や予防に応用可能で、処方実施による生体反応について、早急に詳細な解析が必要と考えた。

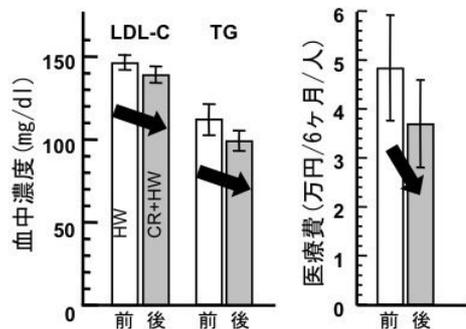


図1 CR+HWグループのLDL-コレステロールやトリグリセリドレベルがHWグループよりも改善し(左)、介入期間を含む6ヶ月間の医療費が減少した(右)。

脂質異常症の基礎研究は、既に膨大な論文が報告されてきた。脂質異常症には高脂血症とHDL低下症があり、主要HDLアポリタンパク質A-II (ApoA-II) はヒトとマウスのみ存在することから、マウスを利用した研究はHDLを中心としたヒト脂質異常症研究に有用である。しかし、一方で、マウス血漿にはVLDLやLDLが少なくHDLが多いため、ヒトに外挿するには問題があるとの指摘もなされてきた。研究代表者らは、アポリタンパク質A-I (ApoA-I) 欠損 (KO) マウスの研究から、加齢によってKOのリポタンパク質プロファイルが高分子HDLやLDLの増加に転じる現象を発見した²⁾(図2)。ApoA-Iの欠損と加齢がリポタンパク質を巨大化させ、LDL過多へとシフトさせることは、ヒトの加齢に伴う脂質動態変化を解析する上で意義深い。また、ApoA-II 過剰発現トランスジェニック (Tg) マウスも作出し、Tgが高コレステロール血症を示すこと³⁾(図3上)、糖代謝異常を有すること(第27回日本老年学会総会(東京2011)、図3下)も明らかにしている。

脂質プロファイルが異なる中高齢マウス

を利用し、運動や摂餌制限時の体内動態を解析すれば、ヒト中高年の健康増進策構築の有用な基盤データになり得ると考え、本研究を立案した。

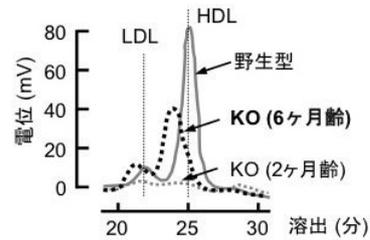


図2 ApoA-I欠損マウス(KO)の2ヶ月齢では血漿リポタンパク質含量が非常に少なかったが、加齢により増加し、野生型よりも高分子側にシフトしていた。

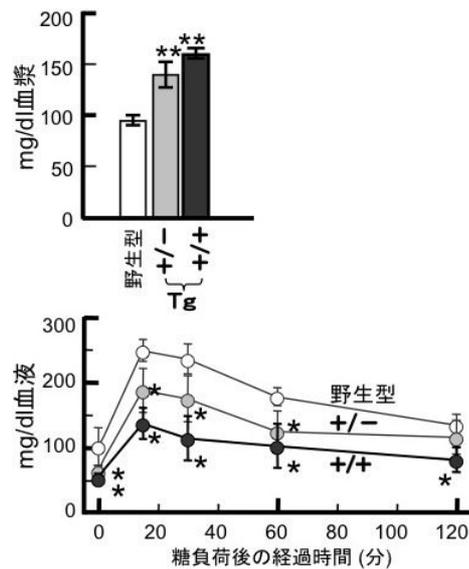


図3 上) ApoA-II過剰発現マウス(Tg)の総コレステロール値は野生型よりも高値だった。下) Tgの空腹時血糖値(0分)は野生型よりも低値で、糖負荷後の血糖値上昇も少なかった。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 野生型

2. 研究の目的

成年・高齢マウスと加齢性全身性疾患モデルマウスを用い、カロリー制限と個体別強度の走行運動による生体変化を解析し、試行した健康増進策の有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 中・高齢マウスの解析

7あるいは10ヶ月齢のSenescence-Accelerated Mouse Prone 1 (SAMP1)を中高齢モデル、8ヶ月齢のC57BL/6J- $A^{y/+}$ を中年過食性肥満モデルとして使用した。それぞれの系統の雌に、軽度カロリー制限 (CR、自由摂餌群の90%量を給餌)、個体の走行力に応じた強度のインターバル速歩 (High-intensity interval running (HR)、(3分歩+3分走)×5回/セット、1セット/日、4日/週)、両処方の併用 (CHR) を3週間実施した。期間内の体重推移、摂餌量、実施前後の運動量、糖代謝能、体温変化、実施後の血液生化学パラメータと腹部脂肪量を計測した。また、実施後

の主要臓器、骨格筋、脂肪組織における脂質代謝・糖代謝関連タンパク質の発現量、ミトコンドリア機能、病理所見を解析した。

(2) 加齢性疾患モデルマウスの解析

全身性老化 (AApoAII) アミロイドーシスを加齢性疾患モデルとして、研究代表者等が開発・維持している本症好発マウスの R1.P1-ApoA2² コンジェニック (SAMR1C)^{3,4} を用いた。2ヶ月齢の雌に HDL 構成成分である ApoA-II に由来するアミロイド線維 AApoAII を投与し、アミロイドーシスを誘発した。誘発と同時に CR (自由摂餌群の 70%量を給餌) あるいは HR を 16 週間実施し、実施後の病態を評価した。また、肝臓を用い、炎症、ストレス応答、オートファジーやミトコンドリア機能に関連するタンパク質をコードする遺伝子群の発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 中・高齢マウス

中高齢モデル SAMP1 では、介入前の 7ヶ月齢と 10ヶ月齢を比較すると、10ヶ月齢の方が空腹時高血糖、低体温、低運動量がみられた (図 4, 5, 6)。3 週間の介入による摂餌量は、7ヶ月齢開始群では自由摂餌群 (Cont, HR) の 89.82% (CR) と 87.47% (CHR)、10ヶ月齢開始群では 89.35% (CR) と 89.42% (CHR) で、いずれも軽度なカロリー制限だった。介入後、HR、CR、及び CHR 群の空腹時低体温症状は軽快化し、自発運動量も増加傾向だった (図 5, 6)。また、介入後の空腹時血糖値には顕著な改善が無かったが (図 4)、血清インスリン値が減少する傾向にあり、インスリン抵抗性の改善が示唆された (図 7)。さらに、7ヶ月齢からの介入では、介入群のレプチンレベルの減少が顕著で、10ヶ月齢開始群もアディポネクチンレベルが増加傾向にあり、いずれの開始時期からでも脂質代謝の改善が示唆された (図 8)。また、10ヶ月齢から CR 介入を施行した群 (CR, CHR) の肝臓で、長寿関連分子である SIRT1 やミトコンドリア機能調節のキー分子である PGC-1 が増加傾向だった (図 9)。

過食性肥満モデル C57-A^{+/+} では、介入中の摂餌量は自由摂餌群 (Cont, HR) の 75.09% (CR) と 76.96% (CHR) で、やや重いカロリー制限だった。介入前の自発運動量は非常に少なかったが、介入後には全匹で運動量が増え (図 6)、空腹時高血糖やインスリン抵抗性が改善していた (図 4, 7)。また、動脈硬化指数 (図 10) やレプチンレベル (図 8) も劇的に改善し、脂質代謝の改善効果が高いことが示唆された。肝 SIRT1 レベルは CR 群で顕著に高く、下流因子 PGC-1 も高値だったが、HR の相加・相乗効果はみられなかった (CHR) (図 9)。

以上から、さらに詳細な作用メカニズムの解析と追試が必要ではあるが、少なくとも、3 週間の極短期間における軽度な介入が代謝

改善効果を示したことは、ヒト中高年の健康づくりへの動機付けを提唱する上で意義ある成果と思われる。

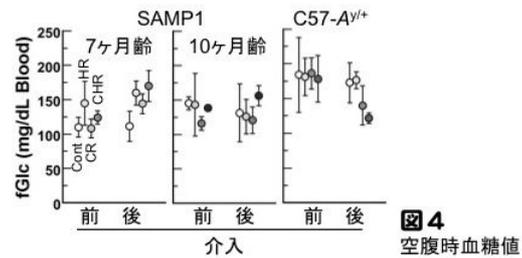


図 4 空腹時血糖値

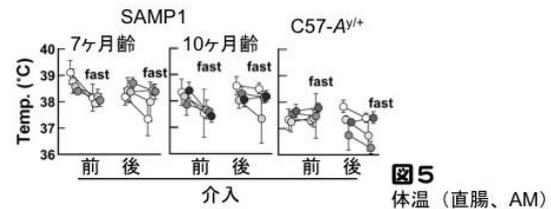


図 5 体温 (直腸、AM)

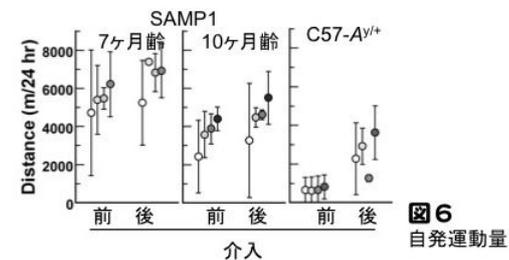


図 6 自発運動量

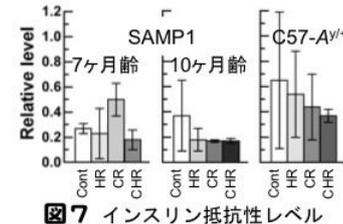


図 7 インスリン抵抗性レベル

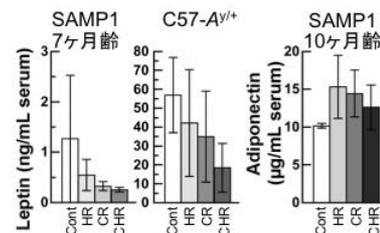


図 8 脂質代謝関連分子の血清レベル

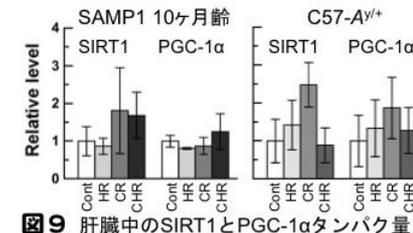


図 9 肝臓中の SIRT1 と PGC-1α タンパク量

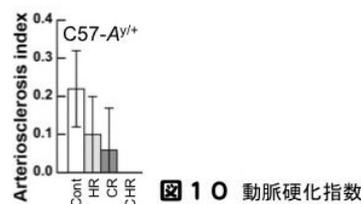


図 10 動脈硬化指数

(2) 加齢性疾患モデルマウス

自由摂餌群のアミロイドーシス誘発後の体重は $18.19 \pm 5.08\%$ 増加した (AL+F) が、誘発しなかった群 (AL+V, $22.09 \pm 9.72\%$) の増加と差はなかった (図 1 1)。一方、CR 介入群では、誘発群 (CR+F, $-12.51 \pm 6.60\%$) も誘発しなかった群 (CR+V, $-1.18 \pm 8.41\%$) も体重は増加しなかった。アミロイド線維の沈着は、CR 未実施群よりも CR 群の方が全身で少なかった (図 1 2)。また、HR 施行でもアミロイド沈着は軽減され、インターバル走行運動にも疾患抑制効果を有する可能性が示唆された (データは示さない)。

本疾患の主なターゲットであり、原因タンパク ApoA-II の生合成臓器でもある肝臓において、ApoA-II の mRNA レベルは群間で差がないにもかかわらず、CR 実施の誘発群 (CR+F) では ApoA-II のタンパクレベルが著しく低く、ApoA-I の mRNA レベルが顕著に高かった (図 1 3)。即ち、CR による ApoA-II のターンオーバーの亢進が示唆された。また、肝臓における SIRT1、SIRT3、及び PGC-1 の mRNA レベルが CR 群 (CR+V, CR+F) で高く (図 1 4)、炎症や酸化ストレス応答に関連したタンパク質をコードする遺伝子群にも変化が得られた (データは示さない)。即ち、CR によって生体防御反応を改善し、全身性加齢疾患の

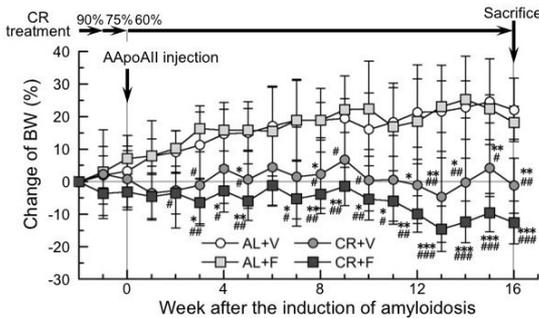


図 11 体重変化と研究スケジュール (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. AL+V. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. AL+F.)

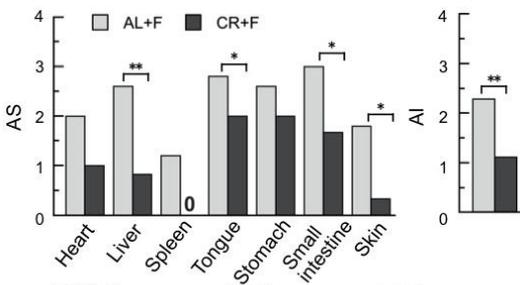


図 12 アミロイド沈着スコア(AS)と評点(AI) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

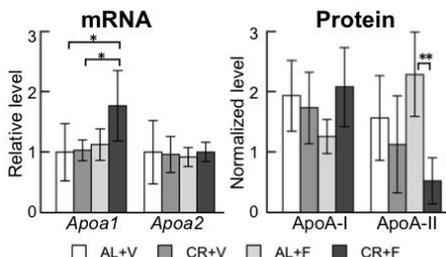


図 13 肝臓における mRNA とタンパクレベル (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

進行を抑制する可能性が示唆され、本研究成果は新たな疾患予防・治療に繋がる基盤データであると考えられた。

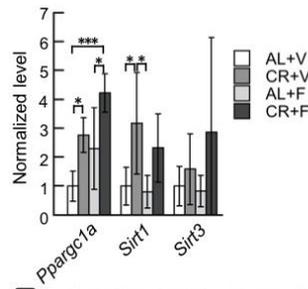


図 14 肝臓における mRNA レベル (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

< 引用文献 >

Sawashita J, Onitsuka S, Gen-no H, Ishikawa S, Iino F, Tateichi N, Murakami T, Seki Y, Nagaiwa T, Hanaoka M, Hama S, Nose H, Higuchi K. (2009) Effects of mild calorie restriction and high-intensity interval walking in middle-aged and older overweight Japanese. *Exp Gerontol* 44(10): 666-75.

Wang Y, Sawashita J, Qian J, Zhang B, Fu X, Tian G, Chen L, Mori M, Higuchi K. (2011) ApoA-I deficiency in mice is associated with redistribution of apoA-II and aggravated AApoAII amyloidosis. *J Lipid Res* 52: 1461-1470.

Ge F, Yao J, Fu X, Guo Z, Yan J, Zhang B, Zhang H, Tomozawa H, Miyazaki J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. (2007) Amyloidosis in transgenic mice expressing murine amyloidogenic apolipoprotein A-II (*Apoa2*^{tg}). *Lab Invest* 87(7): 633-43.

Sawashita J, Zhang B, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Kametani F, Higuchi K. (2015) C-terminal sequence of amyloid-resistant type F apolipoprotein A-II inhibits amyloid fibril formation of apolipoprotein A-II in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 12(8): E836-E845.

5. 主な発表論文等

{学会発表}(計 5 件)

Sawashita J, Li L, Liu Y, Ding X, Yang M, Xu Z, Higuchi K. Caloric restriction prevents the progression of senile AApoAII amyloidosis in mice. The XVth International Symposium on Amyloidosis, 2016.7.3-7, Uppsala (Sweden) (発表確定)

澤下仁子、徐哲、霍佳、樋口京二。軽度な摂餌制限と個々の走力に応じた強度でのインターバル走行運動との短期併用は中高齢マウスの糖・脂質代謝を改善する。第 16 回日本抗加齢医学会総会、2016.6.10-12、横浜

李 琳、澤下仁子、劉 穎業、丁 欣、楊 沐、徐 哲、森 政之、樋口京一。運動とカロリー制限はマウス老化 (AApoAII) アミロイドーシスの発症を軽減する。第 38 回日本基礎老化学会大会、2015.6.12-14、横浜

李 琳、澤下仁子、劉 穎業、丁 欣、楊 沐、徐 哲、森 政之、樋口京一。運動は AApoAII アミロイド沈着を抑制する。日本アミロイドーシス研究会第 2 回学術集会、2014.8.22、東京

〔その他〕

依頼講演、市民公開講座 (計 2 件)

澤下仁子。アミロイドーシスモデルを用いたアミロイド線維形成機構の解析と予防・治療法の構築をめざして。静岡県立大学第 248 回月例薬学セミナー、2015.10.13、静岡

澤下仁子。アミロイドーシスの克服にむけて -モデル動物を利用した発症予防策の探索-。第 2 回信州大学見本市、2015.3.3-4、松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤下 仁子 (SAWASHITA, Jinko)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号：4 0 3 5 9 7 3 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

樋口 京一 (HIGUCHI, Keiichi)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：2 0 1 7 3 1 5 6

(4) 研究協力者

李 琳 (LI, Lin)
信州大学・医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし

徐 哲 (XU, Zhe)
信州大学・医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし

霍 佳 (HUO, Jia)
信州大学・医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし