

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：31301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350820

研究課題名(和文) 生体リズムを応用した体重管理における運動の効果の検証

研究課題名(英文) Effect of exercise for weight control that applied circadian rhythm

研究代表者

藤井 久雄 (FUJII, Hisao)

仙台大学・体育学部・教授

研究者番号：90275587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食は肥満をもたらすことが知られている。近年、高脂肪食が肝臓などの末梢組織において時間遺伝子の発現量を乱し、それが肥満の一因となっていることが報告されてきた。運動はこの乱れを改善することが期待される。本研究では、高脂肪食及び持久性トレーニングが時計遺伝子発現に及ぼす影響について検討することを目的とした。その結果、運動は高脂肪食誘発性肥満ラットへの肥満改善の効果があり、それには生体の生理機能を司る体内リズムに関連した時間遺伝子の発現量が影響することが示された。

研究成果の概要(英文)：The high-fat diet is known to bring obesity. In late years a high-fat diet disturbed the expression of clock-genes in the peripheral organizations such as liver, and it has been reported that it induced to the obesity. Exercise is expected for normalization of this disorder related obesity. In this study, it was intended that examined the influence that a high-fat diet and exercise related to the expression of clock-genes. As a result, exercise improved the weight of high-fat diet-induced obese rat. It was guessed that the effect was affected by the expression of clock-genes related to control of in vivo circadian rhythm.

研究分野：運動栄養学

キーワード：時間遺伝子 肥満 運動 高脂肪食 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活リズムの乱れが肥満を導く一因となる 肥満は生活習慣病のリスクファクターである。肥満はエネルギー摂取量がエネルギー消費量を上回ることによって生じる。しかしながら、平成 22 年度国民健康・栄養調査によると、エネルギー摂取量は年々減少傾向にあることが報告されており、肥満の原因は過食というより、運動や身体活動の不足によるエネルギー消費量の減少が大いに関与している。また、朝食欠食や夜食のような生活の乱れ、食事の欧米化に伴う脂肪の摂取過多のような栄養バランスの乱れもエネルギー代謝に影響を与え肥満を助長することが知られている(永井ら,2005,中村ら,2007)。

(2) 運動は「太りにくい」体質改善に有効である 運動は、呼吸循環機能、細胞内のエネルギー代謝能の亢進等、骨格筋の「質」の改善が期待できる持久性運動、そして骨格筋の「量」の増大が見込めるレジスタンス運動に大別できる。これらの運動を継続することにより、体脂肪量が低下し、除脂肪量の増大した「太りにくい体質」となり、肥満予防につながる(藤井ら,2007,2008)。

(3) 運動時刻の違いは内分泌・エネルギー代謝へ影響を与える 持久系運動の能力は午前より午後の方が優れているとする報告がある(Atkinson et al, 2009)。レジスタンス運動も朝より夕方に実施した方が有効であることが知られている。この根拠としては、脂質代謝と関わる甲状腺刺激ホルモン、タンパク質合成に関わる成長ホルモン等の分泌が夜間に増加することで説明されている。

(4) エネルギー消費量は概日リズムのある自律神経系の影響を受ける 食餌などに伴う交感神経系の活性化は副腎髄質からのノルアドレナリンの分泌、 β_3 -アドレナリン受容体(β_3 -AR)を介して、白色脂肪細胞からのエネルギー基質としての脂肪酸化、褐色脂肪細胞から脱共役タンパク質(UCP1)や骨格筋からのUCP3を介したエネルギー消費量(熱産生)を促進する(DIT: Diet Induced Thermogenesis)。エネルギー消費量の規定要因である自律神経系には概日リズムが存在する(Solberg et al,1999,小阪ら,2003)。

(5) 概日リズムの制御機構 概日リズムは、視交叉上核(SCN)にある中枢時間遺伝子、体内の組織に存在する末梢時間遺伝子の連携した制御機構によって調節されている。これらの時間遺伝子のプロモーター領域には調節部位(E-box)があり、正の制御因子(Bmal1, Clock等)および負の制御因子(Per, Cry等)によるフィードバック機構の繰り返しによりリズム(位相)を作り出している。高脂肪食摂取による肥満には、これらの制御因子の位相の変化が関与することが報告されている(Barnea et al,2009, Kohsaka et al,2007)。

(6) エネルギー代謝と概日リズムの制御機構 エネルギー代謝と概日リズムの制御機構は、細胞内の様々な相互作用の調節機構を介して行われている。食餌の乱れはPGC-1を通じて運動能力を低下させ肥満の一因になる(Liu et al,2007)。運動によるエネルギー代謝の中心であるミトコンドリアを増殖、骨格筋の肥大にはPGC-1の増加が関与している(Terada et al,2005)。このことは、運動によって、PGC-1を増加させることによって、食餌の乱れを是正できる可能性を秘めている。

以上、肥満予防の体重管理は、食事管理および運動を組み合わせたプログラムを実施することがポイントとなる。生体リズムはエネルギー代謝に影響を受けると考えられるため、そのリズムを応用した体重管理を検討することは大変意義深い。

2. 研究の目的

本研究では、動物試験により、生体リズムを調整しているエネルギー代謝と概日リズムの制御機構に対する運動の効果を、それに関与する標的遺伝子群の発現量を指標として検証することを目的とした。

平成 25 年度: 6 週間の高脂肪食摂取により、対照ラットと同摂取エネルギー量の食餌にも関わらず体重や内臓脂肪量が有意に増加しているかを確認した。

平成 26 年度: 連日運動(トレーニング)が、高脂肪食・肥満モデルラットのエネルギー代謝と概日リズムの制御機構の標的時間遺伝子の発現量に影響を及ぼすか運動の主導組織である骨格筋を用いて検討した。

平成 27 年度: 連日運動(トレーニング)が、高脂肪食・肥満モデルラットのエネルギー代謝と概日リズムの制御機構の標的時間遺伝子の発現量に影響を及ぼすか肝臓を用いて検討を深めた。

3. 研究の方法

(1) 被験動物と試験デザイン

本実験では 8 週齢で平均体重が約 270g の Wistar 系雄ラット(日本エスエルシー株式会社)60 匹を用いた。室温は 25℃, 湿度 50%, 10:00(ZT0)から 22:00(ZT12)を暗期とし、22:00 から 10:00 を明期とした。ラットは 1) コントロール群(CON 群:n=20), 2)高脂肪食摂取群(HF 群:n=20), 3)高脂肪食摂取+持久性トレーニング群(HF+Tr 群:n=20)の 3 群に平均体重が等しくなるように分け飼育を行った。飼料は CON 群に対して AIN93G(オリエンタル酵母工業)を摂取させ、HF 群及び HF+Tr 群には脂肪エネルギー比率 60%の高脂肪食(HFD60:オリエンタル酵母工業)を与えた。本実験でのラットへの給仕はそれぞれの飼料を ZT0-ZT2(明期摂取), ZT12-ZT14(暗期摂取)で自由摂取させる 1 日 2 食の meal-fed 法を

用いた。また、CON 群の飼料の残量からエネルギー摂取量(kcal)を求め、HF 群と HF+Tr 群のエネルギー摂取量が等しくなるように pair-fed 法を行った。飲料は水道水を用い、自由摂取とした。なお、体重は 2 日に 1 回の頻度で測定した。HF+Tr 群に対するトレーニング強度は 16m/min から開始し徐々に負荷を上げ 21m/min まで負荷を上げるシャトルラン方式を用いた。なお、実験における最終的な運動強度は木下幸文ら (2001) と Suzuki J et al. (1997) を参考にミトコンドリア酸化酵素活性が有意に増加する 60%最大酸素摂取量 (20m/min) を目安に行った。トレーニング強度は 6 週間の持久トレーニング終了後、解剖時での運動の一過性の影響を除くため 48 時間の安静にした後に屠殺した。なお、屠殺は暗期 2 ポイント (ZT14, ZT20)、明期 2 ポイント (ZT2, ZT8) の計 4 ポイントとした。屠殺は体重 100g あたり 20mg のペントバルビタールナトリウム水溶液の腹腔内注射による完全麻酔下で一匹ずつ行った。解剖は開腹後に下大静脈から採血し、心臓を摘出し絶命させた。その後腓腹筋を摘出し、その都度直ちに液体窒素を用いてフリーズクランプし、分析を行うまで -80 で保存した。凍結させた腓腹筋は液体窒素で冷やしたステンレス製鉢の中で粉碎し、そこから腱を除いたものから約 50mg を採取した。内臓脂肪に関しては、副睾丸脂肪、腹膜後方脂肪、および腸間膜脂肪を摘出し、電子天秤で計量した物の合計量を腹腔内脂肪量とした。

なお、ラットの飼育・維持、実験場の取り扱いについては、仙台大学動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

(2) Total RNA 抽出と Real-Time PCR

Total RNA は ISOGEN (株式会社ニッポンジーン, 東京) を用いて抽出した。腓腹筋から得られた Total RNA のうち 2 μ g を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。

遺伝子発現は Applied Biosystems StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いて行った。実験において、当初の cDNA 量は 10ng/ μ l とし、試薬には 2XSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) を用いた。解析対象の標的遺伝子は時間遺伝子 *Bmal1*, *Clock* および *Per2* とした。異なるサンプル間の DNA 量変動をコントロールするため、真核細胞翻訳伸長因子 1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1: *EEF1A1*) を内部標準として用いた。*EEF1A1* の遺伝子発現から解析対象遺伝子発現を相対的に標準化した。得られたデータは Comparative Ct (Ct) 法を用いて解析した。

(3) 統計処理

実験により得られたデータは平均値 \pm 標準偏差で表わした。体重の推移に関しては、時間を要因とした対応のある二元配置分散分析を行い、有意な交互作用が認められた場合には Bonferroni の方法による多重比較検定を行った。腹腔内脂肪量の比較では対応のない一元配置分散分析を行い、その後の検定には Tukey の方法を用いた。遺伝子発現に関しては、時間を要因とした対応のない二元配置分散分析を行い、有意な交互作用が認められた場合には Bonferroni の方法による多重比較検定を行った。J.Reznick ら (BBA, 2013) の方法を参考に、Bonferroni の方法による多重比較検定は、それぞれのタイムポイントにおいて群間差の比較に用いた。統計的有意水準は危険率 5% 未満とした。

4. 研究成果

(1) 結果

体重、内臓脂肪及び累積摂取エネルギー量

図 1 に実験中の体重の推移を示した。飼育終了時の体重は、HF 群が CON 群および HF+Tr 群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.001$)。

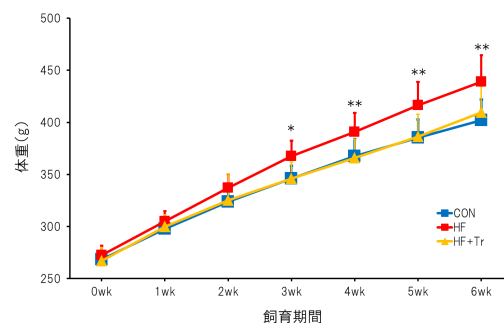


図 1. 3 群の飼育期間中の体重推移

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ vs HF

図 2 に飼育終了時の内臓脂肪量を示した。内臓脂肪量に関しては HF 群の副睾丸脂肪量、腎周脂肪量、腸間膜脂肪量および内臓脂肪量は、それぞれ HF 群および HF+Tr 群の 2 群と比べて有意に高値を示した ($p < 0.001$)。

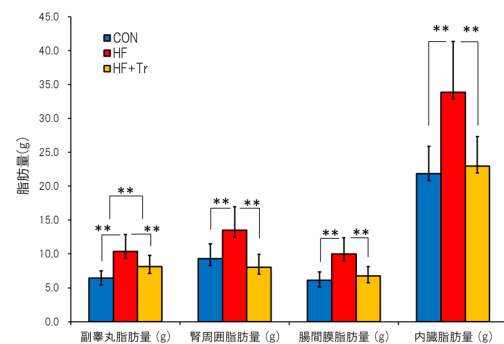


図 2. 3 群の内臓脂肪量 **: $p < 0.001$

なお、累積摂取エネルギー量には3群間に有意差は見られなかった(データは示さず)。

腓腹筋(骨格筋)における時計遺伝子発現

図3に腓腹筋における *Bmal1* の遺伝子発現量を示した。CON群における *Bmal1* の遺伝子発現量は、ZT20においてHF群およびHF+Tr群の2群と比べて有意に高値を示した($p < 0.05$)。

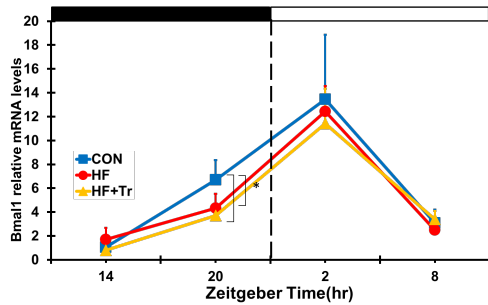


図3. 3群の腓腹筋における *Bmal1* の遺伝子発現量 * : $p < 0.05$

図4に腓腹筋における *Clock* の遺伝子発現量を示したCON群における *Clock* の遺伝子発現量は、ZT20においての他の2群と比べて有意に高値を示した($p < 0.05$)。

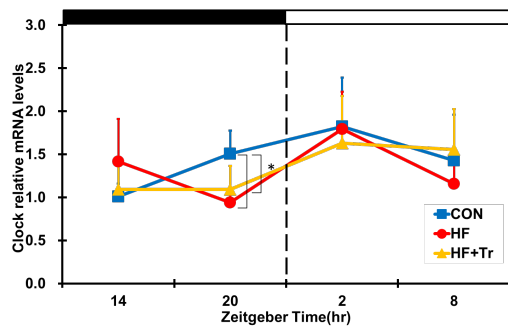


図4. 3群の腓腹筋における *Clock* の遺伝子発現量 * : $p < 0.05$

図5に腓腹筋における *Per2* の遺伝子発現量を示した。4時点ともに、*Per2* の遺伝子発現量は、CON群、HF群およびHF+Tr群の3群間で有意な差は認められなかった。

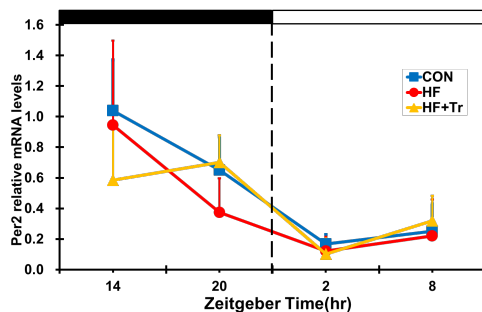


図5. 3群の腓腹筋における *Per2* の遺伝子発現量

肝臓における時計遺伝子発現

図6に肝臓における *Bmal1* の遺伝子発現量を示した。4時点ともに、*Bmal1* の遺伝子発現量は、CON群、HF群およびHF+Tr群の3群間で有意な差は認められなかった。

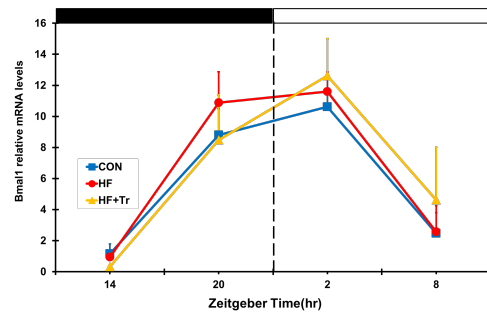


図6. 3群の肝臓における *Bmal1* の遺伝子発現量

図7に肝臓における *Clock* の遺伝子発現量を示した。4時点ともに、*Clock* の遺伝子発現量は、CON群、HF群およびHF+Tr群の3群間で有意な差は認められなかった。

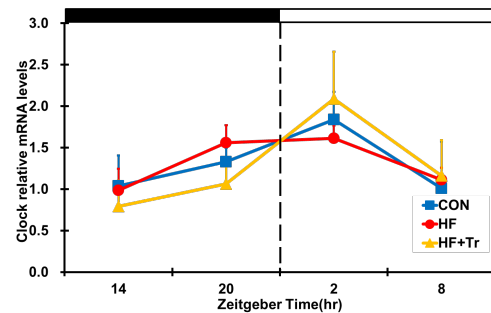


図7. 3群の肝臓における *Clock* の遺伝子発現量

図8に腓腹筋における *Per2* の遺伝子発現量を示した。HF群における *Per2* の遺伝子発現量は、ZT20においてCON群およびHF+Tr群がHF群と比べて有意に低値を示した($p < 0.05$)。

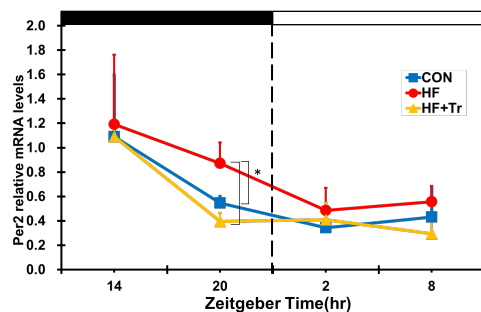


図8. 3群の肝臓における *Per2* の遺伝子発現量 * : $p < 0.05$

(2)考察

本研究では、定時的な高脂肪食の摂取がラットの進退に与える影響について検証を行うと共に、高脂肪食摂取時の持久性トレーニングが与える影響についても検証を行った。この結果、同一のエネルギー量を摂取させてもHF群はCON群と比較して体重が有意に高値を示した。このことから肥満は、摂取エネルギー量ではなく、エネルギー構成が影響となることが示された。本研究の解析対象である標的時計遺伝子は、正の制御因子(CLOCK+BMAL1)と、負の制御因子(PERとCRY)が存在する。これらの遺伝子が互いに作用し合うことで発生する1日の遺伝子発現のリズムが体温や摂食行動、睡眠覚醒サイクル、エネルギー代謝などの生理学的現象の日内変動を司る。このリズムが乱れることは肥満やメタボリックシンドロームをきたす一因となっている。そしてこのリズムを乱す要因として高脂肪食の摂取が報告されている。本研究の結果では、腓腹筋の *Bmal1* および *Clock* は ZT20 において HF 群および HF+Tr 群で有意な低下を認め、定時的な高脂肪食の給餌による骨格筋における振幅の減衰がみられた。骨格筋においては、連日運動(トレーニング)により時計遺伝子リズムは変わらなかった。その一方で、肝臓の *Per2* は ZT20 において HF 群のみで有意な増加が認められ、定時的な高脂肪食の給餌による振幅の減衰および、連日運動による時計遺伝子リズムの改善がみられた。

時計遺伝子の働きとして、Turek FW et al.(2005)、John J et al.(2007) および Staels,B(2006)は *Bmal1* は脂肪組織の分化、脂肪酸・コレステロール合成にかかわる酵素群の遺伝子発現に関与している。そして、*Bmal1* の過剰発現はそれらの増加を示すことを報告している。もう一つの正の制御因子である *Clock* に関して、Oishi K et al.(2006)は時計遺伝子 *Clock* を変異させたマウスと、食欲抑制ホルモンのレプチン遺伝子を欠損させた obesity-/-マウスは脂質代謝機能に影響を与えることを報告した。また Turek F. et al.(2005)は *Clock* 変異マウスに対して高脂肪食を摂取させたところ昼夜なく摂取を続けインスリン分泌不全、肥満、メタボリックシンドロームを呈したことを報告している。本研究で得られた高脂肪食の摂取による体重や内臓脂肪量への弊害、そして運動によるその改善効果も、概日リズム制御を司る時計遺伝子が関与する前述した様々な代謝機能が複雑に関わっている推察された。その点に対するさらなる解明は今後の研究課題としたい。

(3)結論

平成 25 年度：高脂肪食は同じ摂取エネルギー量の食餌にも関わらず体重や内臓脂肪量を有意に増加させた。その一因として体内時計を司る時間遺伝子の発現量が関与し

ていることも確認できた。

平成 26 年度：高脂肪食摂取により発生した体重や内臓脂肪量の増加は6週間の連日運動により改善された。その際、骨格筋において体内時計を司る時間遺伝子の発現量が改善されることはなかった。

平成 27 年度：さらに連日運動が高脂肪食・肥満モデルラットのエネルギー代謝と概日リズムの制御機構の標的時間遺伝子の発現量に影響を及ぼすか肝臓を用いて検討を深めた。その結果、肝臓における時間遺伝子の発現量が改善されることが明らかとなった。

以上のことから、運動による肥満予防の改善の一因として、体内時計を司る時間遺伝子の発現量が関連していると推察された。

なお、運動実施時間帯の違いによる運動の効果を比較検討することについては今後の課題としたい。

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)

藤井久雄, 佐々木繁盛, 真木瑛, 玉崎千尋, アスタキサンチンの単回摂取が間欠的自転車運動時の体温および血液性状に及ぼす影響, 薬理と治療(JPT), 査読有、43-3, 2015, 521-528

[学会発表](計5件)

Fujii H, Tamasaki T, Effects of high-fat diet intake and endurance training on CLOCK gene in rat skeletal muscle, Experimental Biology 2015, Boston(USA), 2015

Taira T, Ogawa S, Fujii H, Watanabe Y, Kato M, Chronic skipping breakfast decrease diet-induced thermogenesis, アジア栄養学会(ACN2015), 横浜(神奈川), 2015

平良拓也, 玉崎千尋, 藤井久雄, 持久性トレーニングが高脂肪誘発性肥満ラットの時間遺伝子に及ぼす影響, 第70回日本体力医学学会大会, 和歌山, 2015

平良拓也, 加藤守匡, 小川静香, 渡部由佳, 藤井久雄, 習慣的朝食欠食が朝食摂取後エネルギー代謝に及ぼす影響, 第70回日本栄養食糧学会大会, 神戸, 2016

平良拓也, 玉崎千尋, 渡部由佳, 藤井久雄, 高脂肪食および持久性トレーニングがラットの時計遺伝子発現に及ぼす影響, 第71回日本体力医学学会大会, 岩手, 2016

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 久雄 (FUJII Hisao)
仙台大学・体育学部・教授
研究者番号：90275587

(2) 研究分担者

白川 仁 (SHIRAKAWA Hitoshi)
東北大学・(連合)
農学研究科(研究院)・准教授
研究者番号：40206280