

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 30 日現在

機関番号：74329

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350916

研究課題名(和文) 運動はメタボリックシンドロームにおける酸化ストレスとHDL機能障害を改善するか

研究課題名(英文) Exercise improves the oxidative stress and the anti-atherogenic function of HDL in metabolic syndrome.

研究代表者

川合 ゆかり (KAWAI, YUKARI)

公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80530253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は運動がメタボリックシンドロームに対しHDL機能改善の面から動脈硬化予防に寄与するかどうかを明らかにすることを目的とした。運動は体組成およびメタボリックシンドロームの診断基準項目や、炎症および酸化ストレスマーカーを有意に改善した。さらにHDL機能がより改善した対象者は、アディポネクチンの増加や酸化LDLの減少が認められた。以上の結果から、メタボリックシンドロームに対する運動効果の1つとして、炎症や酸化ストレスが改善することによって、dysfunctional HDLがfunctional HDLに変換したことが推察され、運動がHDLの抗動脈硬化機能を改善させた可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to elucidate whether contributes to the movement preventing atherosclerosis in terms of functional HDL improvement in the metabolic syndrome. Exercise training was significantly improve the diagnostic criteria of metabolic syndrome and inflammation and oxidative stress markers. Furthermore, HDL function was correlated with the levels of oxidized LDL and adiponectin. These findings suggest that the effect of exercise on metabolic syndrome to convert the dysfunctional HDL into functional HDL by improving inflammation and oxidative stress. Exercise can become effective means to improve the anti-atherogenic function of HDL.

研究分野：応用健康科学

キーワード：HDL機能 メタボリックシンドローム 運動 酸化ストレス 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

好ましくない生活習慣などにより、内臓脂肪が過剰蓄積しメタボリックシンドロームが発症すると、慢性炎症や酸化ストレスが惹き起こされる。慢性炎症や酸化ストレスは、メタボリックシンドロームと心血管イベント・糖尿病発症との間に介在する極めて重要なファクターと考えられている。一方、日本人における心血管イベントの発症のリスクとして低HDLコレステロール血症が重要視されており、メタボリックシンドロームの診断基準にも“HDLコレステロール値 40mg/dL未滿”が含まれている。運動はメタボリックシンドローム改善に有効であること、特にその改善効果としてHDLコレステロールを増加させることが数多く報告されている。さらに最近ではHDLの量のみならずHDLの質に関しても関心が寄せられている。ここ数年HDLの質に関する研究が進み、いわゆるdysfunctional HDLの存在が指摘されており、メタボリックシンドロームでdysfunctional HDLが生じるとされている。またこのdysfunctional HDLは炎症や酸化ストレスによりfunctional HDLから可逆的に生成するものと想定されている。メタボリックシンドロームに対する運動の効果は、炎症や酸化ストレスを改善しdysfunctional HDLを本来のfunctional HDLに変換し、HDLの抗動脈硬化機能を改善させる有効な手段となる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

運動がメタボリックシンドロームにおけるHDLの機能改善の面から動脈硬化予防に寄与するかどうか、また酸化ストレスや炎症の改善がそれにどのように関わるかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

運動を中心としたメタボリックシンドローム改善プログラムを用いて、介入試験を行った。対象者はメタボリックシンドロームおよびその予備群に該当する男性28名で、そのうち19名を運動プログラム実施群、9名をコントロール群とした。

運動を中心としたメタボリックシンドローム改善プログラム

基本運動プログラムを図1に示す。

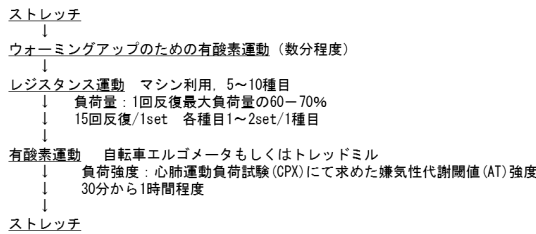


図1 基本運動プログラム

近年レジスタンス運動後に有酸素運動を行うことで、体脂肪減少効果がより高まることが報告された。このことを考慮して、本研究で採用したプログラムは安全かつ脂肪利用の高まるような運動プログラムである。さらに体脂肪の減少には運動施設における定期的な運動だけでなく、日常生活における身体運動量を増やすことが効果的である。この2つを合わせ、運動を中心としたメタボリックシンドローム改善プログラムとした(図2)。

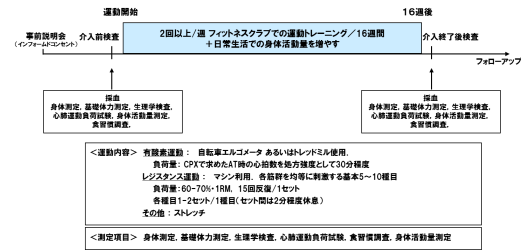


図2 運動プログラムおよび検査プロトコール

運動プログラム実施群には前述の基本運動プログラムに従い、週に2回以上フィットネスクラブにて運動トレーニングの実施、加えて日常生活での身体活動を増加させることを16週間継続させた。各測定および採血は、運動プログラム開始前と運動プログラム終了後に実施した。コントロール群は、運動プログラム実施群と同様の検査のみを実施した。評価項目は血圧、腹囲計測、体組成は同時多周波インピーダンス法によるInBody730 (インボディジャパン)、内臓脂肪面積はCTにて測定した。身体活動量は3軸加速度センサーを用いた身体活動量計(アクティマーカー: パナソニック電工)を装着させ、1週間あたりの3METs以上の身体活動量のデータを得た。運動耐容能は自転車エルゴメータによる心肺運動負荷試験を実施し、最高酸素摂取量 (peak VO₂)を測定した。

血液測定項目: 採取した血液は常法により血清分離を行い検査に用いた。血液生化学項目は日立クリニカルアナライザーM40 (積水メディカル(株))にて測定した。血中の総アディポネクチン(Total-Ad)、炎症性サイトカインとしてTNF- α をELISA、CRP、IL-6をCLEIAにて測定した。血中酸化ストレスマーカーとしてカルボニル化タンパク(Protein carbonyl)、ヘキサノイルリジン(HEL)をELISAで測定した。酸化LDLはマロンジアルデヒド修飾LDL(MDA-LDL)をELISAにて測定した。血清中のアポタンパク質AI、AIIは免疫比濁法で測定した。リポタンパク分析は高感度ゲル濾過HPLC法を応用した分析法(Okazaki M et al. ATVB 2005)を用い、各リポタンパク分画は、サブフラクション解析、粒子サイズさらに各リポタンパク分画の粒子数(Okazaki M et al. J Oleo Sci 2016)

を測定した。HDLの機能の評価としてHDL逆転送系におけるコレステロール引き抜き能(Cholesterol efflux: Khera AV et al. NEJM 2011)を測定した。リポタンパク分析は(株)スカイライト・バイオテック(Lipo SEARCH®)に委託して測定した。

すべての結果は平均値±標準偏差にて表示した。統計学的有意差の検定にはJMP ver.10を用い、各測定項目のプログラム前、16週間後の比較解析にはPaired t-test, Wilcoxon signed rank test, 各因子の相関関係の検定には, Spearman's rank correlation coefficientを用いた。統計的有意水準は両側検定で5%未満とした。

4. 研究成果

対象者の身体特性を表1に示す。運動プログラム実施群, コントロール群間で身体特性に有意差は認められなかった。

表1 対象者の身体特性

	運動プログラム群		コントロール群	
	プログラム前	プログラム後	プログラム前	プログラム後
対象者数	19		9	
年齢(歳)	45.1 ± 6.2		46.0 ± 7.0	
身長(cm)	171.3 ± 6.5		169.9 ± 6.8	
体重(kg)	81.5 ± 9.1		75.4 ± 7.0	
BMI	27.8 ± 3.3		26.1 ± 1.9	
体脂肪率(%)	28.9 ± 5.3		26.7 ± 3.6	
腹囲(cm)	96.0 ± 7.0		92.8 ± 4.6	

mean ± SD

1) 運動プログラム実施による体組成および各パラメーターの変化

体組成および各パラメーターの変化を表2に示した。なおプログラム前値は運動プログラム群及びコントロール群間で有意差は認められなかった。運動プログラム群において体重は平均 - 6.1kg, 体脂肪率は平均 - 15%, 内臓脂肪面積(VFA)は平均 - 31.3%とそれぞれ有意な減少が認められ, MetSの診断基準項目のうち, TGは平均 - 25.3%の有意な改善が認められた。HDL-Cも5.4%の増加を示したが, 空腹時血糖値とともに有意な変化ではなかった。インスリン抵抗性の指標であるHOMA-Rも有意な改善が認められた。

表2 運動プログラム前後の体組成および血液パラメーターの変化

	運動プログラム群			コントロール群		
	プログラム前	プログラム後	p値	プログラム前	プログラム後	p値
体重(kg)	81.5 ± 9.1	75.4 ± 8.1	<0.001	75.4 ± 7.0	76.0 ± 6.7	NS
体脂肪率(%)	28.9 ± 5.3	24.5 ± 5.9	<0.001	26.7 ± 3.6	27.3 ± 3.3	NS
収縮期血圧(mmHg)	125 ± 11	119 ± 11	0.001	126 ± 16	128 ± 18	NS
拡張期血圧(mmHg)	78 ± 8	74 ± 10	0.002	78 ± 7	80 ± 9	NS
腹囲(cm)	96.0 ± 7.0	90.1 ± 7.2	<0.001	92.8 ± 4.6	93.6 ± 3.6	NS
内臓脂肪面積(cm ²)	103 ± 35	72 ± 26	<0.001	102 ± 38	105 ± 44	NS
空腹時血糖値(mg/dl)	89 ± 8	87 ± 9	NS	78 ± 7	83 ± 7	NS
TG(mg/dl)	138 ± 74	101 ± 55	<0.001	129 ± 50	124 ± 59	NS
HDL-C(mg/dl)	50.3 ± 9.9	51.8 ± 9.0	NS	53.9 ± 11.0	54.1 ± 13.0	NS
TC(mg/dl)	205 ± 32	191 ± 33	0.013	212 ± 28	217 ± 32	NS
LDL-C(mg/dl)	111 ± 22	105 ± 25	NS	117 ± 18	123 ± 23	NS
HOMA-R	1.91 ± 0.84	1.47 ± 0.72	0.009	1.49 ± 0.64	1.81 ± 1.10	NS

mean ± SD

運動プログラム実施群はプログラム後に週あたりの3METs以上, 4METs以上とともに身体活動量の有意な増加を認め, 運動耐容能の指標であるpeak Vo₂もプログラム後に有意な増加が認められた。なおコントロール群はプログラム前後ですべての項目について有意差は認められなかった(表3)。

表3 運動プログラム前後の身体活動量および運動耐容能の変化

	運動プログラム群			コントロール群		
	プログラム前	プログラム後	p値	プログラム前	プログラム後	p値
身体活動量						
3METs以上/週(Ex/w)	23.4 ± 9.2	33.4 ± 10.9	0.002	23.4 ± 10.9	24.0 ± 14.6	NS
4METs以上/週(Ex/w)	8.8 ± 6.6	17.6 ± 7.3	<0.001	6.9 ± 5.3	6.9 ± 6.3	NS
Peak Vo ₂ (ml/min/kg)	28.1 ± 5.4	30.0 ± 5.1	0.042	28.4 ± 4.9	25.8 ± 4.0	NS

mean ± SD

2) 血中アディポネクチン, 炎症性サイトカイン及び酸化ストレスマーカーの変化

結果を表4に示した。Total-Adはプログラム前後で平均18.2%の有意な増加を示した。炎症性サイトカインであるCRPは平均 - 24.3%, TNF-αは平均 - 15.1%, IL-6は平均 - 18.3%とプログラム前後で有意な減少を示した。MDA-LDLは平均 - 10.5%, 酸化ストレスマーカーはカルボニル化タンパクが平均 - 9.5%とプログラム前後で有意な減少を示した。なおコントロール群はプログラム前後ですべての項目について有意差は認められなかった。

表4 運動プログラム前後の血中アディポサイトカインおよび酸化ストレスマーカーの変化

	運動プログラム群			コントロール群		
	プログラム前	プログラム後	p値	プログラム前	プログラム後	p値
Total-Ad(μg/ml)	2.94 ± 1.15	3.46 ± 1.50	0.001	3.24 ± 0.68	2.98 ± 0.86	NS
CRP(mg/L)	1123 ± 603	680 ± 727	0.043	830 ± 524	744 ± 398	NS
TNF-α(pg/ml)	1.08 ± 0.33	0.86 ± 0.15	0.010	0.96 ± 0.25	0.88 ± 0.24	NS
IL-6(pg/ml)	2.77 ± 1.32	2.24 ± 1.29	0.006	2.63 ± 0.61	2.21 ± 0.64	NS
MDA-LDL(U/L)	166 ± 75	140 ± 65	0.040	199 ± 80	184 ± 79	NS
HEL(nmol/L)	44.7 ± 18.3	40.1 ± 16.3	NS	39.2 ± 15.6	32.7 ± 14.7	NS
Protein carbonyl(nmol/mg protein)	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.5	0.030	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.5	NS

mean ± SD

3) HDLのコンポーネント及び機能の変化

プログラム前後のHDLのコンポーネント(アポタンパク, 脂質量)及びHDLの粒子サイズ, 粒子数, Cholesterol effluxの変化を表5に示した。apoAIはプログラム前後で4.6%の有意な増加を示した。HDL中の脂質はプログラム前後でHDL-TGのみ - 13.6%の有意な減少を示した。HDLの粒子サイズはプログラム前後で有意な増加を示した。HDL中の総粒子数はプログラム前後において変化は認められなかったが, HDLの粒子径によりLarge HDL, Medium HDL, Small HDLとグループ分けして各グループの粒子数を比較したところ, Large HDLの粒子数においてプログラム前後で有意な増加を認めた。Cholesterol effluxは運動トレーニング群の14検体のみ検討した結果, プログラム前後に

において変化は認められなかった。なおコントロール群はプログラム前後ですべての項目について有意差は認められなかった。

表5 運動プログラム前後の HDL コンポーネントおよび機能の変化

	運動プログラム群			コントロール群		
	プログラム前	プログラム後	p値	プログラム前	プログラム後	p値
HDL						
Apoprotein AI (mg/dl)	130 ± 15	135 ± 13	0.049	139 ± 22	144 ± 27	NS
Apoprotein AII (mg/dl)	29.8 ± 3.9	28.9 ± 3.5	NS	32.0 ± 4.2	33.1 ± 6.3	NS
Total Lipid (mg/dl)	161 ± 24	162 ± 24	NS	164 ± 32	170 ± 33	NS
Cholesterol (mg/dl)	47.2 ± 10.4	49.1 ± 8.9	NS	49.7 ± 10.5	50.5 ± 11.2	NS
Triglyceride (mg/dl)	13.5 ± 3.8	11.5 ± 3.3	0.003	13.4 ± 3.9	13.2 ± 5.6	NS
Phospholipid (mg/dl)	99.8 ± 14.1	102 ± 15.5	NS	101 ± 21.8	106 ± 21.7	NS
Particle size (nm)	10.6 ± 0.2	10.7 ± 0.3	0.007	10.6 ± 0.2	10.6 ± 0.2	NS
Total particle numbers (nM)	15392 ± 2321	15047 ± 1661	NS	10498 ± 1551	9950 ± 1182	NS
Large particle numbers (nM)	1261 ± 604	1498 ± 650	0.007	1398 ± 441	1512 ± 653	NS
Medium particle numbers (nM)	3630 ± 608	3598 ± 648	NS	3698 ± 523	3725 ± 839	NS
Small particle numbers (nM)	10498 ± 1551	9950 ± 1182	NS	10988 ± 1642	10625 ± 1318	NS
Cholesterol Efflux (%)	3.69 ± 1.22	3.24 ± 1.57	NS	NA	NA	

mean ± SD, Total Lipid: cholesterol+ triglyceride+phospholipid, NA: not assessed

4) HDL 機能の変化と血中アディポサイトカイン及び酸化ストレスマーカーとの関係

4-1) HDL の Cholesterol efflux と血中アディポサイトカイン及び酸化ストレスマーカーとの関係

プログラム前後の Cholesterol efflux の変化と血中アディポネクチン，炎症性サイトカイン (CRP, TNF- α , IL-6) の変化の間には相関関係は認められなかった。Cholesterol efflux が増加した者と，減少した者とに分かれたことから，Cholesterol efflux の増加群，減少群の2群に分け，改めて各々の指標との関係を検討した。その変化を表6に示す。Cholesterol efflux 増加群において，Total-Ad が有意な増加を示した。CRP は減少傾向を示した。一方 IL-6 においては両群ともに有意な減少を示した。Cholesterol efflux 増加群において，Cholesterol efflux の変化と血中アディポネクチンの変化の間に正の相関傾向が認められた ($r=0.763$, $p=0.077$)。また酸化ストレスの指標であるカルボニル化タンパクとの間には相関関係は認められなかった。

表6 運動プログラム前後の血中アディポサイトカイン及び酸化ストレスマーカーの変化 (コレステロール引き抜き能による2群比較)

	Cholesterol Efflux 増加群			Cholesterol Efflux 減少群		
	プログラム前	プログラム後	p値	プログラム前	プログラム後	p値
Total-Ad ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.56 ± 0.51	3.01 ± 0.69	0.019	3.13 ± 1.67	3.79 ± 2.29	NS
CRP (mg/L)	1432 ± 1325	562 ± 416	0.089	768 ± 860	502 ± 683	NS
TNF- α (pg/ml)	1.03 ± 0.40	0.86 ± 0.17	NS	1.63 ± 1.64	2.10 ± 3.40	NS
IL-6 (pg/ml)	3.27 ± 0.94	2.61 ± 1.06	0.049	1.96 ± 0.66	1.23 ± 0.39	0.021
HEL (nmol/L)	38.3 ± 13.6	35.8 ± 14.4	NS	48.0 ± 21.6	43.4 ± 18.9	NS
Protein carbonyl (nmol/mg protein)	2.0 ± 0.3	1.7 ± 0.2	0.029	1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.3	NS

mean ± SD

4-2) HDL のコンポーネントおよび粒子数，粒子サイズの変化と酸化ストレスマーカーの変化との関係

プログラム前後の HDL のコンポーネント及び粒子数，粒子サイズの変化と酸化ストレスマーカーの変化を検討したところ，相関関係は認められなかったが，HDL の粒子サイズの変化と MDA-LDL の変化の間に有意な負の相関関係が認められた ($r = -0.576$, $p=0.020$)。

5) 考察

本研究は運動継続により HDL の量および機能がどのように変化をするか，さらに酸化ストレスや炎症マーカーにどのような影響を与えるかを明らかにし，それらがどのように動脈硬化予防に寄与するか，さらには HDL の機能改善のサロゲートマーカーを明らかにすることを目的とした。

週2回以上，運動施設での運動トレーニング実施に加えて日常生活での身体活動を増やすことを16週間継続するというプログラムにて介入研究を実施した。その結果，運動プログラム前後で体組成および内臓脂肪面積，運動耐容能に有意な改善が認められ，メタボリックシンドロームの診断基準項目のうち TG においても有意な減少が認められた。しかし HDL-C，空腹時血糖値には有意な変化が認められなかった。空腹時血糖値が変化しなかった理由としては対象者の大多数が基準値内であったことが考えられる。抗炎症作用を示す Total-Ad は有意な増加を示し，炎症マーカーの CRP, TNF- α , IL-6 は有意に減少した。また酸化ストレスマーカーのカルボニル化タンパクは有意な減少を示した。これらの結果より，今回の運動プログラムは慢性炎症及び酸化ストレスの改善に対して有効であることが確認された。

運動プログラム実施により，HDL の量的変化のみならず機能改善が起こりうるのかどうかを明らかにするための検討を行った。HDL-C は運動プログラム群では多くの対象者で増加していたが，有意な変化には至らなかった。これまで運動と HDL-C について多数報告されているが，HDL-C の増加を示している論文は比較的運動強度の高いものが多い。今回 HDL-C に有意な変化が認められなかった理由として，運動の強度の違いや対象者数が少なかったことによる可能性が考えられる。さらに HDL の抗動脈硬化的機能の代表的なものとして，組織からのコレステロールの引き抜き能と抗酸化機能について検討した。ABCA1 経路による Cholesterol efflux は運動プログラム前後で変化が認められなかった。しかし Cholesterol efflux が増加した群だけで検討したところ，Cholesterol efflux の変化と血中アディポネクチンの変化の間に正の相関傾向が認められた。HDL-C や apoA1 には，Cholesterol efflux 増加群，減少群との間で変化に差は認められなかった。この結果からは HDL の主要な機能である Cholesterol

effluxの増加はHDL-CやapoAⅠの変化よりもアディポネクチンの変化を確認することにより推測できる可能性が考えられる。アディポネクチンは運動により増加し、さらにアディポネクチンレセプターの発現も増加することが報告されている。また、アディポネクチンがマクロファージの ABCA1 を増加させ、コレステロール引き抜き促進を介して動脈硬化予防に寄与する可能性が示されている。これらの先行研究結果より、運動がアディポネクチンを増加させることでHDLのコレステロール引き抜き能を高める可能性が考えられる。今回例数が少なかったため、アディポネクチン増加と Cholesterol efflux 増加とが相関傾向を示すにとどまり、明確な関係を示すことができなかったが、今後例数を増やして確認する必要がある。

今回、Cholesterol efflux 増加群では、CRPの低下傾向および IL-6 の有意な低下、カルボニル化タンパクの有意な低下が認められ、慢性炎症、酸化ストレスの改善が明らかであった。一方、Cholesterol efflux 減少群ではそのような結果が認められなかった。つまり、運動トレーニングで HDL による Cholesterol efflux が増加、すなわち functional HDL に変化するためには、慢性炎症や酸化ストレスが明らかに改善している必要があると考えられた。

HDL の抗動脈硬化機能として、酸化 LDL 生成抑制作用が知られている。今回、酸化 LDL の指標とした MDA-LDL は、運動トレーニングにより低下を示した。次に HDL 粒子の特徴と MDA-LDL の変化との関係について検討したところ、運動による HDL 粒子サイズの変化と MDA-LDL の変化に負の相関が認められた。つまり、運動トレーニングの結果として HDL 粒子サイズが大きくなるのが、酸化 LDL の減少に關与する可能性が考えられた。HDL 中には Paraoxonase-1 (PON-1) が含まれ、これが酸化 LDL 生成を抑制する抗酸化酵素として働くことが報告されている。運動による HDL の粒子サイズの増加が PON-1 の量や活性に影響し、酸化 LDL 減少をもたらした可能性も考えられるが、今回 PON-1 について測定していないので、PON-1 の関与は不明である。今後、HDL 粒子分布が大粒子にシフトした際の PON-1 量・活性の変化、PON-1 の安定性について検討することで、運動による HDL の酸化 LDL 抑制機能向上のメカニズムの一端を明らかにすることができると思う。

以上の結果から、運動は炎症や酸化ストレスを改善することに伴い、メタボリックシンドロームにおいて生成が想定されている dysfunctional HDL を functional HDL に改善して、抗動脈硬化作用をもたらす可能性が示唆された。今後さらに対象者数を増やして詳細を明らかにしていく必要があると思う。

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)

〔学会発表〕(計2件)

1) 高波嘉一、川合ゆかり、青井渉、谷村祐子、市川寛

運動療法による脂質代謝改善効果 - 酸化ストレスの影響を含めて - (シンポジウム：運動と脂質代謝)

第 68 回日本体力医学会大会 2013.9.21 東京

2) 高波嘉一、川合ゆかり、青井渉、谷村祐子、市川寛、木村穰、吉川敏一

メタボリックシンドロームに対する運動療法が動脈硬化危険因子に及ぼす影響

第 15 回日本抗加齢医学会総会 2015.5.31 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川合 ゆかり (KAWAI, Yukari)

(公財)ルイ・パストゥール医学研究センター・基礎研究部・室長

研究者番号：80530253

(2) 研究分担者

高波 嘉一 (TAKANAMI, Yoshikazu)

大妻女子大学・家政学部・教授

研究者番号：40206777

谷村 祐子 (TANIMURA, Yuko)

愛知東邦大学・人間学部・助教

研究者番号：90551458