

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25560380

研究課題名(和文)高地環境ストレス(低酸素・低温)による褐色脂肪細胞の活性化と抗肥満対策

研究課題名(英文)The effects of environmental stresses of high-altitude (i.e., hypoxia and hypothermia) on activation of brown adipose tissue and anti-obesity.

研究代表者

田口 貞善 (Taguchi, Sadayoshi)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：90086819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体の生理的適応反応を惹起し得る低温と低酸素環境を材料とし、その環境が代謝特性へ及ぼす詳細なメカニズムを、特に褐色脂肪細胞関連タンパク質(Uncoupling protein 1: UCP1)の活性化にフォーカスして解析し、その適応反応を通して生体レベルでの脂質代謝亢進を誘発することを目的とした。その結果、低酸素環境はUCP1には影響しないが、再エステル化を含む脂肪合成を抑制することで、脂肪蓄積を低下させる作用があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to examine the effects of hypoxia and hypothermia on fat metabolism by focusing on UCP1 (Uncoupling protein 1), which is related to brown adipose tissue. We found that hypoxia might not influence the UCP1 expression, while it may inhibit the lipogenesis, thereby reducing the lipid storage in adipocytes.

研究分野：運動生理学

キーワード：高所 低酸素 脂質代謝 脂肪蓄積 肥満

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームが問題とされる昨今、効果的な抗肥満法の策定は極めて重要な課題である。運動トレーニング以外で、生体内の代謝応答を高め得る環境ストレスとして、低酸素と低温環境が挙げられる。低酸素において、申請者はこれまで低酸素環境や心筋梗塞などに対する骨格筋や心筋の収縮特性や代謝特性の適応を組織化学的・生化学的手法を用い明らかにしている (Hashimoto, Taguchi et al., 2003, 2004a, 2004b, 2005)。一方、肥満患者を対象とした4週間の有酸素運動による体脂肪の減少効果は低酸素環境下での運動の方が効果的という報告 (Wiesner et al., 2010) を受け、申請者は脂肪細胞を5%の低酸素環境で1日あるいは1週間培養した。その結果、1日の低酸素刺激で脂肪細胞内の脂肪滴が縮小化すること、そして、1週間の低酸素刺激で脂肪滴が顕著に減少し、細胞内トリグリセリド量も顕著に低下することを認めた。また、申請者は、ヒトにおいて、一過性の低温曝露 (-15°C) が脂質代謝の亢進を誘発することを認めている (Yamauchi et al., 2012)。このように、低酸素・低温環境は、代謝特性を劇的に変化させ、生理的な適応反応を惹起すると考えられるが、その分子機序は未解明なままであった。

2. 研究の目的

環境変化は代謝特性を劇的に変化させ、生理的な適応反応を促し、身体機能に影響を及ぼす。本研究では、生体の生理的適応反応を惹起し得る低温と低酸素環境を材料とし、その環境が代謝特性へ及ぼす詳細なメカニズムを、特に褐色脂肪細胞関連タンパク質 (Uncoupling protein 1: UCP1) の活性化にフォーカスして解析し、その適応反応を通して生体レベルでの脂質代謝亢進を誘発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 末梢の組織の酸素分圧は吸気よりも低くなり、高地環境や激しい運動など、相対的な酸素需要量が高まった際には脂肪組織中の酸素濃度は5%以下になると考えられる (Wood et al., Pflugers Arch, 2011)。そこで、12-well プレートに撒いた3T3-L1脂肪細胞を分化させた後、分化誘導後の5日目から7日間、5%の低酸素環境で培養した低酸素1週間群 (Hypoxia-Long 群)、分化誘導後の11日目から1日間、5%の低酸素環境で培養した低酸素1日群 (Hypoxia-Short 群) の2群を設けて低酸素刺激を加え、分化誘導後の5日目からそのまま7日間常酸素で培養した常酸素群 (Normoxia Control 群) と、以下の2項目について比較検討した。

細胞内トリグリセリド量: TG E-test kit (Wako) を用いて生化学的に測定する。

アドレナリンによる脂肪分解刺激を加えた際の培地に放出されたグリセロールと脂

肪酸の濃度: TG E-test kit (Wako) と NEFA C-test kit (Wako) を用いて生化学的に測定する。

(2) 上記の3群におけるUCP1の発現量をウエスタンブロッティング法により解析し、脂肪合成能や脂肪分解活性とどのように関連するのかを検討した。

(3) 骨格筋培養細胞を低酸素環境下で培養し、代謝特性や形態特性を観察した。低酸素環境は、培地中のグルコースの利用を変化させ、細胞の増殖や分化に影響を及ぼす可能性を検討した。

(4) 白色脂肪におけるFollistatinが脱共役タンパク質1(UCP1)の発現を誘引する可能性が示唆されている (Braga et al., 2014)。一方、慢性的な自発的走運動と乳酸を基軸とした飲用物(サプリメント)の経口投与が、ラット骨格筋のFollistatin発現量を高めることを我々は認めている (Hashimoto et al. in preparation)。そこで、同ラット白色脂肪組織におけるFollistatinならびにUCP1のタンパク質発現量増加を、ウエスタンブロッティングを用いて検討することとした。

6週間高脂肪食を摂食したラットを安静コントロール群、自発性回転運動機で運動させた群、自発性回転運動機で運動+サプリメントを投与した群にわけ、5週間飼育した。運動は週3日間1日おきに実施し、非運動日にサプリメントを経口投与した。各群の精巢上体と鼠蹊部の脂肪組織中のFollistatinならびにUCP1のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングで検出し比較することを試みた。

(5) ヒトの応用実験として、人工気象室を用いて、低酸素環境下における運動時のエネルギー利用について検討した。

4. 研究成果

(1) 低酸素刺激が脂肪細胞の脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。長期間低酸素刺激を加え続けたHypoxia-Long群で、トリグリセリド量は他群に比して有意に減少した。脂肪滴の形態については、常酸素環境で培養したNormoxia Control群と比して、短期間低酸素刺激を加えたHypoxia-Short群では、脂肪滴はやや縮小化し、Hypoxia-Long群では顕著に小さくなり、その数も減少した (Hashimoto et al., 2013)。

低酸素刺激に応答して脂肪細胞の脂肪蓄積が減少するのは、脂肪分解が亢進しているためと仮説をたて、アドレナリン刺激に応答した脂肪分解活性を解析した。仮説に反し、長期間低酸素刺激を加え続けたHypoxia-Long群で、グリセロールと脂肪酸の放出量は常酸素環境で培養したNormoxia Control群と比して有意に減少した。また、短期間低酸素刺激を加えたHypoxia-Short群でも、Normoxia Control群と比してグリセロールと脂肪酸の放出量は有意に減少した。

一方、基底状態での脂肪分解活性についても解析した。短期間低酸素刺激を加えた

Hypoxia-Short 群で、常酸素環境で培養した Normoxia Control 群や長期間低酸素刺激を加え続けた Hypoxia-Long 群と比して、グリセロールの放出量は有意に減少した。一方、脂肪酸の放出量は Hypoxia-Long 群で顕著に増加していた。Normoxia Control 群で脂肪分解活性の指標であるグリセロール放出は、Hypoxia-Long 群のそれよりも高値を示したのに対し、脂肪酸放出は検出レベルに至らなかった理由は、細胞内に放出された脂肪酸が再エステル化によって脂肪の合成に利用されたためであると推察した。

脂肪酸の再エステル化には、培地中のグルコース、ピルビン酸、乳酸由来から産生された glycerol 3-phosphate が必要となる (Forest et al., 2003)。そこで、脂肪細胞に対する低酸素刺激が、基底状態での単位時間あたりのグルコースの取り込み量におよぼす影響を解析した。長期間低酸素刺激を加え続けた Hypoxia-Long 群で、常酸素環境で培養した Normoxia Control 群や短期間低酸素刺激を加えた Hypoxia-Short 群と比して、グルコースの取り込み量は有意に減少した。これらの結果から、Hypoxia-Long 群では、再エステル化の影響が弱く、トリグリセリドが加水分解されて細胞内に放出された脂肪酸の多くが細胞外へ放出されたと推察された (Hashimoto et al., 2013)。

(2) 上記の 3 群における UCP1 の発現量は、どの群においても極めて低かった。低酸素刺激は、UCP1 よりも、再エステル化を含む脂肪合成を抑制することで、脂肪蓄積を低下させる作用があると考えられた。さらに、脂肪細胞に対する低酸素刺激が、脂肪酸合成酵素 (Fatty Acid Synthase, FAS) と脂肪細胞の分化に重要な役割を果たす peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) の発現量におよぼす影響を解析した。Hypoxia-Long 群の FAS は、Normoxia Control 群と比して有意に減少した。低酸素刺激に対して、PPAR γ は減少する傾向が認められた (Hashimoto et al., 2013)。

(3) 脂質代謝のキータンパク質である carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) や uncoupling protein 3 (UCP3) の発現量も解析した。低酸素刺激は、CPT1 の発現量には影響しなかったが、UCP3 の発現量は増加する傾向が認められた。一方、骨格筋、細胞への低酸素刺激は、筋の肥大および分化を減弱もしくは遅延させる可能性が示唆された。

本研究においては、低酸素刺激は筋を萎縮させる結果となった。この生理学的意義として、筋線維を細くすることによって単位筋横断面積あたりの毛細血管密度を高め、少ない酸素量で代謝を維持する方略であると考えられたが、この可能性については、今後のさらなる検証が必要である。

(4) 今回ラットに与えた運動や栄養介入により与えたストレスは Follistatin や UCP1 の発現に大きな影響を与えなかった結果が得ら

れた (Hashimoto et al. in preparation)。

(5) ヒトのパイロット実験では、高所 4000m 相当の低酸素環境下における低強度運動は、常酸素環境下と同一動作の運動であるにも関わらず、運動強度を上昇させ、血中乳酸濃度を増加させた (小池ら 2015)。このことから低酸素環境下における運動は解糖系のエネルギー利用を促進することが考えられるが、脂質代謝との関連性についてはさらなる検討が必要である (Yamauchi et al. in preparation)。

これらの基礎データを基に、ヒトが本来持つ環境適応能力を最大限に生かし、過食・運動不足を導き出した常温・都市化による均一環境である現代社会を見直し、メタボリック症候群 (肥満) や糖尿病などの生活習慣病の予防・改善法の新たなエネルギー代謝改善法を探索していく。

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 9 件)

1) Takakura H, Ojino M, Jue T, Yamada T, Furuichi Y, Hashimoto T, Iwase S, and Masuda K. Intracellular oxygen tension limits muscle contraction-induced change in muscle oxygen consumption under hypoxic conditions during Hb-free perfusion. *Physiological Reports*, 5: e13112, 2017. (査読有り)

2) Taguchi S, Ogoh S, Hashimoto T, Yamasaki S, Okamoto H, Yamori Y, Hatton DC, and McCarron DA. Spaceflight and biohistochemical alterations of antigravity soleus muscle in spontaneously hypertensive rats (SHR) to dietary low- and high-calcium intake. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, 8(3):41-47, 2016. (査読有り)

3) Morita N, Yamauchi J, Kurihara T, Fukuoka R, Otsuka M, Okuda T, Ishizawa N, Nakajima T, Nakamichi R, Matsuno S, Kamiie S, Shide N, Kambayashi I and Shinkaiya H. Toe flexor strength and foot arch height in children. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 47: 350-356, 2015. (査読有り)

4) Otsuka M, Yamauchi J, Kurihara T, Morita N and Isaka T. Toe flexor strength and lower-limb physical performance in adolescent. *Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche*. 174: 307-313, 2015. (査読有り)

5) Yamauchi J, Kurihara T, Yoshikawa M, Taguchi S, and Hashimoto T. Specific characterization of regional storage fat in upper and lower limbs of young healthy adults. *SpringerPlus* 4: 402, 2015. (査読有り)

6) 松生香里, 岡崎和伸, 杉田正明・長距離・マラソン選手の腸内環境とコンディションの関連 -意識調査と外環境の変化に伴う影響について- . *陸上競技研究紀要* . Vol.10, p71-86, 2014. (査読無し)

7) Masuda S, Tanaka T, Masuzaki H, Nakao K, and Taguchi S. Overexpression of leptin reduces the ratio of glycolytic to oxidative enzymatic activities without changing muscle fiber types in mouse skeletal muscle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37(1): 169-173, 2014. (査読有り)

8) Kurihara T, Yamauchi J, Otsuka M, Tottori N, Hashimoto T, and Isaka T. Maximum toe flexor muscle strength and quantitative analysis of human plantar intrinsic and extrinsic muscles by a magnetic resonance imaging technique. *Journal of Foot and Ankle Research*, 7:26, 2014. (査読有り)

9) Hashimoto T, Yokokawa T, Endo Y, Iwanaka N, Higashida K, and Taguchi S. Modest hypoxia significantly reduces triglyceride content and lipid droplet size in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(1):43-49, 2013. (査読有り)

〔学会発表〕(計 15 件)

1) Hashimoto T and Osaki T. The effect of hypoxia on skeletal muscle characteristic. The 94th Annual meeting of the Physiological Society of Japan, March 29, 2017. 浜松アクトシティコンgresセンター(静岡県浜松市)

2) Kim J, Yoo C-S, Hashimoto T, Tomi H, Kawasaki M, Lim K. Lactate and Caffeine treatment can increase fat oxidation on resting metabolic rate in rats. *The 67th Annual meeting of Korean Society of Food Science and Nutrition*, November 2, 2016. Jeju, Korea

3) Yoo C-S, Kim J, Hashimoto T, Tomi H, Kawasaki M, Teramoto N, Lim K. Effect of Caffeine and Lactate mixture treatment on gene expressions related to energy metabolism in rat skeletal muscle. *The 67th Annual meeting of Korean Society of Food Science and Nutrition*, November 2, 2016. Jeju, Korea

4) 小池英晃, 森田憲輝, 小山桂史, 橋本健志, 田口貞善, 山内潤一郎. 高所 4000m 酸素環境下における活動筋の発汗特性. 第 70 回日本体力医学会大会, September 18, 2015 (体力科学 64(6): 644, 2015). 和歌山県民文化会館(和歌山県)

5) 山内潤一郎, 小池英晃, 清水麻由子, 湯浅健人, 小山桂史, 橋本健志, 田口貞善. 歩動作時の上肢と下肢: ヒトが 4 足で歩くと? 第 70 回日本体力医学会大会, September 18, 2015 (体力科学 64(6): 562, 2015). 和歌山県民文化会館(和歌山県)

6) 小池英晃, 森田憲輝, 小山桂史, 橋本健志, 田口貞善, 山内潤一郎. 高所 4000m 酸素環境曝露における低強度運動時のエネルギー利用と血中乳酸濃度. 第 164 回日本体力医学会関東地方会, July 11, 2015. 桐蔭横浜大学(神奈川県)

7) Taguchi S, Otsuka M, Suzuki K, Yamasaki S,

Kitagawa K, Yin X-J, Ji L, Zhou Y-R, Liu X, and Hashimoto T. Ambient Particular Matter (pm) Exposure Deteriorates Pulmonary Function in Early Childhood in Shanghai, China. 62th American College of Sport Medicine, May 29, 2015. San Diego (USA)

8) 小池英晃, Kimi Kobayashi, 小山桂史, 田口貞善, 山内潤一郎. 吸湿式発汗計によるヒト運動時の部位別発汗と筋活動. NSCA ジャパンストレングス&コンディショニングカンファレンス 2014, December 6, 2014. 国士館大学(東京都)

9) 山内潤一郎, 小山桂史, Kimi Kobayashi, 小池英晃, 田口貞善. ヒトはなぜ二足で歩くのだろうか? 第 69 回日本体力医学会大会, September 21, 2014 (体力科学 63(6): 611, 2014). 長崎大学(長崎県)

10) 小池英晃, Kimi Kobayashi, 小山桂史, 田口貞善, 山内潤一郎. ダイナミック運動時の活動筋の発汗特性について. 第 69 回日本体力医学会大会, September 20, 2014 (体力科学 63(6): 594, 2014). 長崎大学(長崎県)

11) Yoshikawa M, Kurihara T, Taguchi S, Yamauchi J, and Hashimoto T. The relationship between subcutaneous fat and intramuscular lipid in human limb. 19th European College of Sport Science, July 3, 2014. Amsterdam (Netherlands)

12) 吉川万紀, 栗原俊之, 田口貞善, 山内潤一郎, 橋本健志. ヒト上腕部における皮下脂肪と筋内脂肪の関係. 第 68 回日本体力医学会, September 22, 2013. 日本教育会館(東京都)

13) Yoshikawa M, Kurihara T, Taguchi S, Yamauchi J, and Hashimoto T. Body composition of human limbs by using BIA and MRI. 18th European College of Sport Science, June 28, 2013. Barcelona (Spain)

14) Yin X-J, Ji C-Y, Ji L, Guo Q, Li S-C, Taguchi S, Tanaka T. Relationship between Waist Circumference and Body Mass Index in Chinese Children and Adolescents. 60th American College of Sport Medicine, May 29, 2013. Indianapolis (USA)

15) Taguchi S, Masuda S, Egawa T, Hayashi T. Aging, not Inactivity, Alters Lactate Metabolic Properties to Facilitate Lactate Oxidation In Fast-type Skeletal Muscle. 60th American College of Sport Medicine, May 29, 2013. Indianapolis (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 貞善 (TAGUCHI, Sadayoshi)
立命館大学・総合科学技術研究機構・教授
研究者番号: 90086819

(2) 研究分担者

山内 潤一郎 (YAMAUCHI, Junichiro)
首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号：70552321

橋本 健志 (HASHIMOTO, Takeshi)
立命館大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号：70511608

松生 香里 (MATSUO, Kaori)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60513570