

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350880

研究課題名(和文) 運動療法による動脈硬化抑制機序の研究—血管内皮の転写因子発現量の検討から—

研究課題名(英文) A study of inhibitory effects of exercise for a progression of arteriosclerosis - quantitative analysis of transforming factors of endothelial cells

研究代表者

岡田 恭司 (Okada, Kyoji)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10185431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：25週齢の雄C57BL/6Jマウスを高脂肪食で8週間飼育し、その後運動なしのコントロール群、低頻度運動群、高頻度運動群に分類し、小動物用トレッドミルで5度傾斜、速度10 m/sで30分間の運動を8週間行わせた。骨格筋を採取し、DNA microarrayを行い、遺伝子の発現を比較検討した。高頻度運動群では体重が少なく、IPGTTの軽度改善が見られ、遺伝子ではTrgv2 Iglv1 など免疫に関わる遺伝子の高発現が著明で、Arrdc3 Them5などのenergy consumptionにかかわる遺伝子は発現が低下していた。メタボでは慢性炎症に対し運動が抑制的に働いているものと考察した。

研究成果の概要(英文)：C57BL/6J male mice (n = 7/group) were fed with the Western diet including 13 % fat for 8 weeks. Mice were then divided into 3 groups (control group; 1/week group; 3/week group), and exercise were performed for 8 weeks. The expression of approximately 20,000 transcripts in muscle tissues from each group was assessed using oligonucleotide microarray analysis. Exercise training improved body weight induced by the Western diet. Sixty genes were differentially expressed in the 3/week group, compared with the control group. Over expression profiles involved in genes associated with immunological responses, and down regulation were observed in genes associated with energy metabolism. Our study showed beneficial effects of exercise training in preventing the development and metabolic disorders in middle-aged mice with diet-induced metabolic syndrome.

研究分野：メタボリック症候群に対する運動療法

キーワード：メタボリック症候群 運動療法 炎症

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群に対しては、薬物療法と食事療法の他に運動療法が広く行われている。一般的にはリズムカルな運動を、一日おきに30分程度行うことが最も効果的であるとして推奨されている。しかし、より高頻度の運動のほうが有効とする報告もあり、いまだに意見の一致を見ておらず、運動療法の作用機序についてもいまだに不明の点が多いと言われている。

メタボリック症候群は成人の中でも40歳以上の壮年層に多く、種々の合併症を抱えた初老期にもみられ、年齢に応じた適切な運動療法の強や頻度が処方されるべきであり、その作用機序の解明がより効果的なメタボリック症候群に対する治療体系の構築のため必要である。しかし、マウスを対象とした研究では若年層を対象としたものが多く、壮年から初老期のマウスを用いた運動療法の研究は少ない

メタボリック症候群では、動脈硬化を背景とした虚血性心疾患や脳血管障害の発症が大きな問題点である。動脈硬化の原因として注目されているのが血管内皮細胞上に発現する Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) である。LOX-1 が酸化 LDL や、細菌、糖化蛋白質、活性化血小板などと結合すると、血管内皮傷害のシグナル伝達が始まり、動脈硬化の発症につながるとされている。また LOX-1 リガンド濃度と可溶性 LOX-1 値から得られる解析値が脳梗塞や虚血性心疾患の発症のリスク因子になるなど、LOX-1 はメタボリック症候群での動脈硬化発症に深く関わっている受容体であると言える。さらにメタボリック症候群では血管内皮細胞で前述の LOX-1 だけでなく、eNOS や PPAR- α が動脈硬化発症に関与していることが推定されている。しかしメタボリック症候群に対する運動療法の研究で、LOX-1 や eNOS、さらに PPAR- α の血管内皮細胞での発現を総合的に検討した研究はなく、また壮年期のマウスを対象とした研究は見られるが、初老期のマウスを対象とした研究は非常に少ない。

さらにメタボリック症候群では脂肪組織に慢性炎症が生じており、これがインシュリンの感受性の低下など種々の病態悪化につながる要因とされている。メタボリック症候群に対して広く行われている運動療法の有効性は証明されているが、上記の脂肪組織の炎症

に対する効果、特に遺伝子レベルでの反応については明らかにされていないのが現状である。

メタボリック症候群に対する運動療法により血管内皮と脂肪組織にどのような反応が生じるのか、その過程を遺伝子レベルで種々の年代のマウスを用いて明らかにする必要があると考えられる。

2. 研究の目的

中年～初老期のメタボリック症候群マウスに対する運動療法の適切な強度と頻度を明らかにし、さらにはその効果、特に血管内皮や脂肪組織における遺伝子レベルの反応を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 壮年期の脂質異常、耐糖能異常マウスの作成

10週齢の雄C57BL/6Jマウス(日本クレア)40匹を通常餌で25週まで飼育し、壮年期マウスとし、これ以降餌を高脂肪食 Western飼料(オリエンタル酵母社製)に変更し、8週間飼育した。各マウスはそれぞれ独立したケージで飼育し、自由に運動させた。実験開始から終了まで餌、水は同一で自由摂取とし、体重、摂餌量は2-3日間隔で測定した。室温は 20 ± 2 度で一定とし、明暗周期は12時間とし、明期は7:00-19:00、暗期は19:00-7:00で飼育した。

(2) トレッドミルによる運動負荷

肥育したマウスを運動なしのコントロール群、低頻度群(週1回月曜日のみの運動)、高頻度群(週3回月、水、金曜日の運動)の3群に分類し、小動物用トレッドミル(室町社製)を用い、マウスの $65\%V_{O_2Max}$ の条件である5度上方傾斜、速度10 m/sで30分間運動させた。運動を行う期間は8週間とし、最終的に41週まで観察した。

(3) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT)

IPGTTではマウスを無麻酔下で腹腔内注入によって糖を負荷し、糖負荷前、負荷後30分、60分、120分の時点で尾静脈から採血して血糖値をスタットストリップ(ニプロ)で測定した。IPGTTは運動期間前と運動期間終了時に2回行った。

(4) 運動能の計測

ロタロッドシステム(NeuroScience社製)を用い、マウスをロッド上に置き、その後ロッドを回転させ、ロッド上に何秒とどまることができるかを計測した。この計測は運動期間前と運動期間後に2回行

った。

(5) 組織採取

運動期間が終了した時点で、全身麻酔下に脾臓、肝臓、腎臓、肺、脂肪組織（褐色と白色）、大動脈、骨格筋、精巣を採取し、一部は次項の組織染色のために10%中性ホルマリンで固定し、残りはsnap freezingして凍結保存した。ホルマリン固定は36時間とし、通常法でパラフィン包埋した。

(6) 組織染色

採取した組織をマイクロトームで4 μmに薄切し、脾臓、肝臓、腎臓、肺、脂肪組織（褐色と白色）、大動脈、脳、骨格筋、精巣で通常のHE染色の他に、PPAR-、LOX-1、eNOSそれぞれの抗体を用いて免疫染色を行い、運動頻度別の発現の程度を比較検討した。各臓器間での発現の相関関係も検討した。

(7) DNA microarrayによる解析

前項で凍結保存した組織からRNAを抽出し、DNA microarrayを行い、遺伝子の発現を比較検討した。

4. 研究成果

高頻度群ではコントロール群に比べ体重が有意に少なく、IPGTTのうち60分と120分で軽度改善が見られた。ロタロッドシステムを用いた運動能の改善は明らかでなかった。

組織学的には血管内皮の形態には群間で差は見られず、脂肪組織内の炎症の程度にも差が認められなかったが、コントロール群に比べ運動を高頻度で行った群では、やや血管壁の肥厚が対象よりも軽く、脂肪組織内の線維化の範囲が狭くなっている傾向が認められた。免疫組織学的にはPPAR γ の高発現が高頻度群の肝臓、脾臓の血管内皮、脾臓のランゲルハンス島で認められた。低頻度群ではい所に述べた所見は認められなかった。LOX-1とeNOSの血管内皮での発現は全ての群で認められなかった。

DNA microarrayでは遺伝子約60個の高発現が高頻度群で観察された。中でもTrgv2 Iglv1 Cd3g Traj37 Tcrg-V4などのimmunoresponseに関わる遺伝子の高発現が著明であり（表1）、一方でArrdc3 Them5などのenergy consumptionに関わる遺伝子は発現が低下していた（表2）。血管内皮でのNOSの産生に関与する遺伝子の発現は有意でなかった。高頻度群と比べ低頻度群ではコントロール群と比べ、遺伝子の発現は著しい差が見られなかった。低頻度群ではこれらの変化は体重以外は見られなかった。

Metabolic syndromeに対する運動療法は、週3回行うと有効性が高く、壮年マウスであっても、また食事内容が不適切な

metabolic syndromeを惹起するような食事のままであって、脂肪組織で観察される慢性炎症に対し、抑制的に働いて、さらに適正なエネルギー代謝が導かれているものと考察した。ただし運動療法単独では糖代謝は改善せず、食事療法や薬物療法との併用が必要と考えられた。

表1. 骨格筋で発現が亢進していた遺伝子

| Gene_Symbol | Fold (3/w vs. Ctrl) | Gene_Description |
|-------------|---------------------|------------------------------------|
| Trgv2 | 3.4 | T cell receptor gamma variable 2 |
| Iglv1 | 3.1 | immunoglobulin lambda variable 1 |
| Cd3g | 3.1 | CD3 antigen, gamma polypeptide |
| Traj37 | 2.8 | T cell receptor alpha joining 37 |
| Tcrg-V4 | 2.3 | T cell receptor gamma, variable 4 |
| Traj22 | 2.1 | T cell receptor alpha joining 22 |
| Arrdc3 | 2.5 | arrestin domain containing 3 |
| Them5 | 2 | thioesterase superfamily member 5 |
| Mir29a | 2.1 | microRNA 29a |
| n-R5s213 | 2.3 | nuclear encoded rRNA 5S 213 |
| Slc15a2 | 2.4 | solute carrier family 15 |
| Hspa1b | 2 | heat shock protein 1B |
| Prg4 | 2.4 | proteoglycan 4 |
| Trim63 | 2.1 | tripartite motif-containing 63 |
| Zfp273 | 2.8 | zinc finger protein 273 |
| BC094916 | 2 | cDNA sequence BC094916 |
| Hbb-b2 | 2.6 | hemoglobin, beta adult minor chain |
| Slc43a1 | 2.1 | solute carrier family 43, member 1 |
| Cep85l | 2.2 | centrosomal protein 85-like |
| Mir1a-2 | 4.1 | microRNA 1a-2 |
| Gm25909 | 3 | predicted gene, 25909 |
| Gm23138 | 2.8 | predicted gene, 23138 |
| Gm25805 | 2.2 | predicted gene, 25805 |
| Gm22095 | 2.1 | predicted gene, 22095 |
| Mirlet7f-1 | 2.1 | microRNA let7f-1 |
| AF357399 | 2.1 | snoRNA AF357399 |
| Gm10032 | 2.1 | predicted gene 10032 |
| Gm22519 | 2.1 | predicted gene, 22519 |

表 2 . 骨格筋で発現が低下していた遺伝子

| Gene_Symbol | Fold (3/w vs. Ctrl) | Function |
|-------------|---------------------|-------------------------------|
| Mest | 0.16 | development |
| Scd2 | 0.42 | fatty acidsformation |
| Plin1 | 0.39 | lipid droplets storage |
| Tusc5 | 0.33 | fat metabolism |
| Lipf | 0.3 | neutral lipid metabolism |
| Npr3 | 0.27 | related obesity |
| Lep | 0.157 | regulation of body weight |
| Nmrk2 | 0.36 | NAD metabolism |
| Nnat | 0.396 | nervous system formation |
| Ptger3 | 0.38 | neurons |
| Mir194-2 | 0.41 | stability of mRNAs |
| Sfrp5 | 0.4 | Wnt signaling |
| Fads3 | 0.44 | molecular oxygen |
| Serpina3c | 0.32 | inhibit cathepsin G |
| Acta2 | 0.49 | Cell motility |
| Col15a1 | 0.49 | Stabilizes microvessels |
| lfi44 | 0.45 | form microtubular structures. |
| Mpz | 0.37 | peripheral myelin sheath form |
| Hp | 0.19 | intestinal permeability |
| Trp53i11 | 0.49 | Tumor induced protein |
| Gm22577 | 0.49 | Unknown |
| Gm22105 | 0.49 | Unknown |
| Gm22939 | 0.47 | Unknown |
| Mir883a | 0.44 | Unknown |
| Gm25669 | 0.44 | Unknown |
| Gm10944 | 0.41 | Unknown |
| Igkv14-126 | 0.3 | Unknown |
| Tmem45b | 0.28 | Unknown |

文献

1. Moraes-Silva IC, Mostarda C, Moreira ED, et al. Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. J Appl Physiol 2013;114:786-91.
2. Inoue N, Okamura T., Kokubo Y, et al. LOX Index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. Clin Chem 2010;56:550-8.
3. Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. Ann N Y Acad Sci. 2002;959:66-81.

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 0 件) 投稿中が 1 件

〔 学会発表 〕 (計 1 件)

第 3 回北斗星勉強会、2017 年 3 月、秋田市

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔 その他 〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡田恭司 (Okada Kyoji)

秋田大学大学院医学系研究科保健学専攻理
学療法学講座 教授

研究者番号 : 10185431

(2)研究分担者

若狭正彦 (Wakasa Masahiko)

秋田大学大学院医学系研究科保健学専攻理
学療法学講座 教授

研究者番号： 70375070

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()