

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03097

研究課題名(和文) アスリートパラドックスの全容解明と臨床応用の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the athlete paradox and examination of clinical application

研究代表者

河盛 隆造 (KAWAMORI, ryuzo)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：00116021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋細胞内は肥満状態になっているのにも関わらずインスリン感受性が高い、いわゆる「アスリートパラドックス」の全容を解明し、メタボリックシンドローム予防の一助とするため検討を行ったところ、PGC1Aプロモーター領域のメチル化率に差が見られ、血中、骨格筋中の脂質組成が運動強度によって異なる組成となったことより、アスリートパラドックスの一因としてエピジェネティクスによる遺伝子制御の影響が存在する可能性が示唆され、メタボリックシンドローム予防のためには特に運動強度の設定が重要になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle from exercised-trained subjects can display high insulin sensitivity, despite intramuscular lipid levels that exceed those of obese and diabetic individuals, a phenomenon described as the “athlete paradox”. However it is unknown whether exercise intensity is reflect to lipid alterations and insulin sensitivity. To clarify its mechanisms, we investigated PGC1 promoter methylation ratio and the role of exercise intensity on intramyocellular lipid level and insulin resistance. As a result, between the athlete and the control, there was a difference in the methylation rate on the PGC1 promoter. On the other hand, the composition of skeletal muscle intracellular lipid and blood lipid differed in change depending on exercise intensity. These results suggest that epigenetic regulation is one of the causes of athlete paradox and setting exercise intensity is important for prevention of metabolic syndrome.

研究分野：代謝内分泌医学

キーワード：アスリートパラドックス 骨格筋 骨格筋細胞内脂質 インスリン感受性 運動

1. 研究開始当初の背景

近年、日本における糖尿病や動脈硬化症の患者数の増加は著しく、早急にその予防を考える必要がある。肥満によりもたらされるインスリン抵抗性は、2型糖尿病やメタボリックシンドロームの根本的原因として認識されてきた。しかしながら、日本の2型糖尿病、動脈硬化症の大多数は非肥満であることがすでに明らかになっており、日本人などの東洋人の糖尿病や動脈硬化症の病態を考える上で、非肥満の病態生理学的な検討が必須である。

この点に関して 1H-magnetic resonance spectroscopy (MRS)法による骨格筋細胞内脂質の測定技術が確立し、細胞内脂質の蓄積が全身的な肥満とは独立してインスリン抵抗性を惹起する可能性が示唆され大変注目されている。我々の施設でも、国内の研究施設としては初めて 1H-MRS 法を用いた研究成果を欧米の学術誌に発表した。それらの結果等から、2型糖尿病では、非肥満の状態でも骨格筋細胞内脂質は健常者の約2倍と筋細胞内は“肥満”状態となっており、インスリン感受性も健常者の約50%しかないこと、

運動療法は、骨格筋細胞内脂質量を減少させ、インスリン感受性を増加させること、3日間の高脂肪食は骨格筋細胞内脂質量を増加させ、インスリン感受性を低下させること^{1,2,3)}などが明らかになった。よって、骨格筋細胞内脂質を減少させる介入を行うことがインスリン抵抗性を改善し、2型糖尿病やメタボリックシンドローム発症予防に繋がると考えられてきた。

しかしながら、我々の検討などから長距離ランナーでは骨格筋細胞内脂質が多いにも関わらずインスリン感受性が高いことが明らかになってきており (Metabolism, 2008 及び未発表データ)、さらに肥満者などでも強度の比較的強い有酸素運動することによ

り同様の現象が生じうるということが明らかとなってきている。これら一連の逆説的な事象は「アスリートパラドックス」と呼ばれ、我々の研究グループは最近になってその分子メカニズムの一部を同定した⁴⁾。

そこで今回、アスリートパラドックスが生じる全容を明らかとするために、

長距離ランナーの筋サンプルを用いて、アスリートパラドックスに関連する候補遺伝子抽出とエピジェネティクスの検討。

異なった運動強度がインスリン感受性と骨格筋、血中脂質組成に与える影響についての検討

を行った。

本研究の結果、現在までに行われてきた骨格筋細胞内脂質を「減らす」という視点ではなく、骨格筋細胞内脂質に「適応する」という全く新たな観点から病態にアプローチすることが可能となり、今後の予防医学上、重要な知見をもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

「アスリートパラドックス」は未だそのメカニズムの全貌が明らかでは無く、その全貌をヒトから動物、細胞レベルまでに渡り詳細に解明していくため、本検討での各機能解析を通して、運動強度や量の組み合わせの最適化や、薬物介入への応用を検討することを目的とし、検討を行った。

3. 研究の方法

長距離ランナーなどから採取した骨格筋生検サンプルを原資として、骨格筋における遺伝子発現解析をマイクロアレイによって行い解析した。それらに対して、RC13 ヒト骨格筋肉腫細胞に対して siRNA ノックダウンシステム系を用いて脂質酸化能に関連する遺伝子発現の

変化等を指標としてスクリーニングを行った。その後、マウス C2C12 筋管細胞に対してノックダウン、過剰発現系を用いた検討により、インスリン感受性、脂質のとり込み量を指標とし、抽出を行った。また、マイクロアレイを行うと同時に定量 PCR 解析を行い、脂質の取り込み、酸化、生合成に関わる遺伝子発現量を検討した。その後、アスリートにおいて発現量が著しく異なる遺伝子に対してエピジェネティクスによる遺伝子発現制御の影響を調べるため、筋サンプルから抽出した DNA に対して、バイサルファイトシーケンス解析によって検討した。

メタボリックシンドロームにある男性計 20 名に対して、運動強度が異なり、かつエネルギー消費量が同等の 2 種類の運動（低強度運動：40% VO₂ peak、高強度運動：70% VO₂ peak、300kcal/day）を 5 日間行い、5 日間の運動前と運動後、またその 2 日後に、高インスリン正常血糖クランプ法によるインスリン感受性と 1H-MRS 法による骨格筋細胞内脂質蓄積量を測定した。また、同時に採血と外側広筋よりの筋生検を行い、液体クロマトグラフィー質量分析にて脂質組成を詳しく検討した。

4. 研究成果

長距離ランナーの筋サンプルからアスリートパラドクスに関連する候補遺伝子の検討

長距離ランナーで特に骨格筋細胞内脂質が多く蓄積しているが、インスリン感受性が高く保たれている者 5 名と BMI をマッチさせた健常者 7 名に対して外側広筋より筋生検を行い、マイクロアレイでの解析を行った。長距離ランナーでは、骨格筋細胞内脂質は健

常者の 4 倍と極めて高かったが、インスリン感受性は両群とも同等で正常であった。骨格筋における遺伝子発現解析をマイクロアレイによって行い、RP 法と ARACNE ネットワーク解析により、両群の違いを中心的に説明しうる 196 遺伝子を抽出した。次に、RC13 ヒト骨格筋肉腫細胞に対して siRNA ノックダウンシステムにより、抽出された 196 の候補遺伝子すべてを個別にノックダウンした。酸化能(oxidative capacity)が高いことが、アスリートパラドクスのメカニズムであることが示唆されていることから、脂質酸化能に関連する遺伝子発現の変化（PGC1A, mtTFA, NRF1, COX4, PPARA）を指標としてスクリーニングを行った。その結果、遺伝子のノックダウンにより、脂質酸化能に関連する遺伝子群のほとんどすべてが低下を示した 47 の遺伝子の内、極めて顕著に低下することが確認された上位 16 遺伝子を抽出した。マウス C2C12 筋管細胞を用いてこれらの遺伝子のノックダウン、過剰発現系を用いてインスリン感受性と脂質（パルミチン酸）の取り込み量にてスクリーニングを行い、4 遺伝子にまで絞り込んだ。

さらに、マイクロアレイ解析後にアスリートの骨格筋中の遺伝子発現量を定量 PCR で確認したところ、多くの脂質代謝関連遺伝子の発現量に差が見られたが、特に脂質代謝の鍵遺伝子といわれる PGC1A がアスリートで

約 2 倍発現量が有意に多かった（図 1）。そこでバイサルファイトシーケンス法にて PGC1A プロモーターのメチル

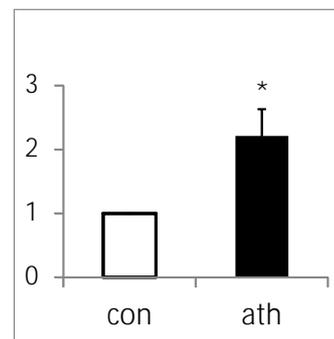


図 1
PGC1mRNA 発現量

化の状況を検討したところ、プロモーター領域のメチル化率に差が見られた。

異なった運動強度がインスリン感受性と骨格筋、血中脂質組成に与える影響についての検討

5 日間の運動前後において、低強度運動群 (n = 11)、高強度運動群 (n = 9) 双方で有意な体重、BMI の変化は認めなかった。しかしながら、低強度運動群では変化しなかったものの、高強度運動群では運動後に体脂肪率

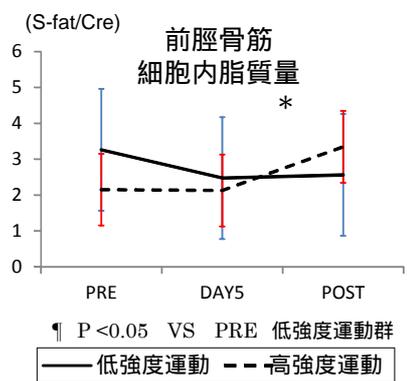


図 2
運動前後の骨格筋細胞内脂質

が有意に減少していた。また、インスリン感受性は双方で運動前後の比較で減少傾向にあったが、特に低強度運動群で有意に減少していた。次に、細胞内脂質を MRS で調査したところ、高強度運動群において運動終了後 2 日目の骨格筋細胞内脂質が有意に上昇していた。しかしながら低強度運動群では変化は見られなかった (図 2)。運動前後で血液中の脂質組成変化について検討したところ、Phosphatidylinositol (PI) で高強度運動群では変化しなかったものの、低強度運動群で有意な減少が見られた。一方、Diacylglycerol (DAG) では総 DAG 量で低強度運動分では変化が見られなかったのに対して、高強度運動群では減少が見られ、特に 16:0/18:1DAG の減少が著明であった。(図 3)。

また、脂質代謝を反映し、初期のメタボリックシンドロームのバイオマーカーになる可能性があるという報告⁵⁾のある DAG の組成

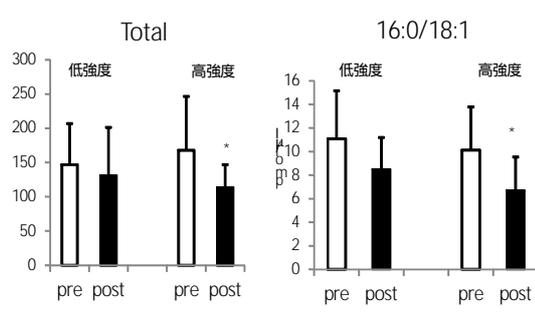


図 3
運動前後の総 DAG と 16:0/18:1DAG

は低強度運動群でほとんど運動前後において差が見られなかったものの、高強度運動群では 16:0/18:1DAG では有意に減少し、18:0/18:1DAG では有意に増加していた。これらのことより、運動強度の違いが運動後の脂質代謝経路の活性変化に及ぼす影響が大きいことが示唆された。

一方、骨格筋細胞内脂質の分析では、Phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidic Acid (PA)については低強度で PI については高強度で運動前後の蓄積量に差が見られた。また、低強度運動において 16 : 0/16 : 0 DAG の減少と 32 : 0 PC,PA の増加が有意にみられるということから、これらが低強度運動によるインスリン感受性改善に関連することが推察された。また、アスリートパラドクスと PI 蓄積量の増加が関連する可能性が示唆されていることと、本検討でも同様の現象がみられることより、PI の増加に関わる分子がアスリートパラドクスに深くかかわっている可能性が推察された。

以上の結果より、アスリートパラドクスの一因としてエピジェネティクスによる遺伝

子制御の影響が存在する可能性が示唆され、メタボリックシンドローム予防のためには特に運動強度の設定が重要になることが示唆された。

参考文献

1. Tamura Y et al. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Jun;90(6):3191-6.
2. Tamura Y et al. Metabolism. 2008 Mar;57(3):373-9.
3. Sakurai Y et al. J Diabetes Investig. 2011 Oct 7;2(5):356-8.
4. Kawaguchi M et al. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Sep;99(9):3343-52.
5. Polewski MA et al. J Lipid Res. 2015 Aug;56(8):1461-70.

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5件)

1. Kaga H, Tamura Y, Takeno K, Takehi S, Funayama T, Furukawa Y, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Giacca A, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H. Correlates of insulin clearance in apparently healthy non-obese Japanese men. Sci Rep. 2017 May 3;7(1):1462. (査読あり)
2. Funayama T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Takehi S, Watanabe T, Furukawa Y, Kaga H, Yamamoto R, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Effects of alcohol abstinence on glucose metabolism in Japanese men with elevated fasting glucose: A pilot study. Sci Rep. 2017 Jan 9;7:40277. (査読あり)
3. Takeno K, Tamura Y, Kawaguchi M,

Takehi S, Watanabe T, Funayama T, Furukawa Y, Kaga H, Yamamoto R, Kim M, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Taka H, Fujimura T, Sawada SS, Giacca A, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Relation Between Insulin Sensitivity and Metabolic Abnormalities in Japanese Men With BMI of 23-25 kg/m². J Clin Endocrinol Metab. 2016 Oct;101(10):3676-3684. (査読あり)

4. Ikeda SI, Tamura Y, Takehi S, Sanada H, Kawamori R, Watada H. Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 2016 May 13;473(4):947-952. (査読あり)
5. Takehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Increased intramyocellular lipid/impaired insulin sensitivity is associated with altered lipid metabolic genes in muscle of high responders to a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016 Jan 1;310(1):E32-40. (査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

1. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H. 62nd Annual Meeting of American College of Sports Medicine. 26-30 May 2015, San Diego USA. Mechanisms of insulin resistance after 24hours physical

- inactivity in murine soleus muscle
2. Kakehi S, Tamura Y, Kawamori R, Watada H. Cell Symposia: Exercise Metabolism. 12-14 July 2015, Amsterdam, Netherlands. Physical inactivity and high fat diet synergistically enhance the accumulation of intramyocellular diacylglycerol and induce insulin resistance in murine soleus muscle
 3. Kakehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. 2nd Congress, International Academy of Sportology. 12 Sep 2015, Tokyo, Japan. Intramyocellular lipid accumulation after high-fat diet is associated with the gene expression involved in lipid metabolism in skeletal muscle of non-obese men
 4. 筧 佐織、田村 好史、池田 真一、河盛 隆造、綿田 裕孝, 第 70 回体力医学学会大会、平成 27 年 9 月 18 日-20 日、和歌山、24 時間の脚ギプス固定は、骨格筋細胞内のジアシルグリセロールを増加させ、インスリン抵抗性を惹起する
 5. 筧 佐織、田村 好史、池田 真一、加賀 直子、河盛 隆造、綿田 裕孝, 分子糖尿病学シンポジウム 平成 27 年 12 月 5 日 東京 高脂肪・不活動による骨格筋インスリン抵抗性惹起メカニズム
 6. Kakehi S, Tamura Y, Kawamori R, Watada H. Cell Symposia: Exercise Metabolism. 21-23 May 2017, Gothenburg, Sweden. Effects of exercise intensity on the insulin sensitivity and lipid composition in

skeletal muscle under the same calorie consumption exercise.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河盛 隆造 (KAWAMORI Ryuzo)
順天堂大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 00116021

(2)研究分担者

田村 好史 (TAMURA, Yoshifumi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 80420834

筧 佐織 (KAKEHI, Saori)
順天堂大学・医学研究科・特任助教
研究者番号 : 00450560