

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01824

研究課題名(和文) 運動誘発性オートファジーにおける運動中および運動後の脂質代謝亢進の役割

研究課題名(英文) The role of lipid metabolism in the exercise-induced autophagy

研究代表者

西田 裕一郎(Nishida, Yuichiro)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50530185

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)：本研究では、遺伝子改変マウス(GFP-LC3)を用いて、脂質代謝への依存度が高い低強度運動とその依存度が比較的低い高強度運動で、骨格筋(腓腹筋)・肝臓等の組織におけるオートファジーの活性化を比較・検討することにより、オートファジーを効果的に活性化する運動条件を明らかにすること、また、運動誘発性オートファジー活性化の機序を探求することを目的とした。GFPの緑色蛍光により肝臓と骨格筋におけるオートファジーの活性化を評価した。本研究の結果から、骨格筋のオートファジー活性化には低強度運動の方が効果が高い可能性、及び肝臓のオートファジーの活性化には高強度運動の方が効果が高い可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究により、一過性の運動によるインスリン作用の改善に骨格筋におけるオートファジーの活性化が必須であるということが報告されたが、骨格筋のオートファジーを最も効果的に活性化する運動条件については全くわかっていなかった。本研究の結果は、骨格筋のオートファジー活性化には低強度運動の方が効果が高い可能性と、肝臓のオートファジー活性化には高強度運動の方が効果が高い可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The current study investigated the effects of low-intensity exercise (10 m/min, 90 min) and high-intensity exercise (15 m/min, 60 min) on the autophagy activation in the liver and skeletal muscle (gastrocnemius muscle) and explored the mechanisms underlying the exercise-induced autophagy activation in male GFP-LC3 mice. Autophagy activation was assessed by the intensity of GFP in the liver and skeletal muscle. The current results suggest that the high-intensity exercise is more effective in increasing the autophagy in the liver in comparison to low-intensity exercise, whereas the low-intensity exercise is more effective for increasing the autophagy in the skeletal muscle in comparison to high-intensity exercise.

研究分野：運動分子生物学

キーワード：運動誘発性オートファジー 有酸素運動 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは、細胞内の不要なタンパク質やダメージを受けた細胞内小器官(ミトコンドリアなど)を多種類の分解酵素を含むリソソームで分解し、その分解産物をエネルギー産生や新たなタンパク質の合成に再利用するために働く仕組みである。細胞内のタンパク質を分解する仕組みとしてユビキチン・プロテアソーム系が知られているが、ユビキチン・プロテアソーム系がタンパク質を個別に特定して分解を行うのに対して、オートファジーは基本的に、分解するタンパク質や細胞内小器官を個別に認識することなく非選択的に分解するシステムである。従って分解しなくてもよい正常なタンパク質や細胞内小器官まで含めて分解を行うが、この仕組みにより古い細胞内成分を壊して新しい細胞内成分への入れ替えを促進することで、細胞内の浄化と細胞内小器官の品質管理に極めて重要な役割を果たしていると考えられている。例えば、ダメージを受けたミトコンドリアがそのまま細胞内に残っていると活性酸素の発生源となってしまうが、オートファジーによってこの有害物質の発生源は分解され、その分解産物は新しいタンパク質を作る材料やエネルギー源として有効に再利用される。実際に、動物モデルを用いた研究により、オートファジーの活性化が寿命を延長することや、糖尿病(インスリン抵抗性)や炎症関連の疾患、認知症(アルツハイマー病)、がん等の病気の発生の抑制につながる事が次々と報告されている(Levine and Kroemer, *Cell*, 2008; Choi et al, *N Engl J Med*, 2013)。

(2) 従ってオートファジーを意図的に活性化できる何らかの方法が見つかれば、上述の糖尿病などの多くの病気の予防・治療に役立つ可能性がある。オートファジーを活性化させる生理学的条件としてカロリー制限(または飢餓)がよく研究されている。オートファジーは酵母などの微生物から線虫、ヒトに至るまでよく保存されている細胞内メカニズムであるが、例えば、線虫でカロリー制限を行うとオートファジーが活性化され寿命の大幅な延長が認められるが、オートファジーの誘導が起らないように遺伝子改変するとカロリー制限による寿命延長効果が消失する(Jia and Levin, *Autophagy*, 2007)。それでは、どうしてカロリー制限がオートファジーを活性化する刺激となるのだろうか? 脂質代謝の亢進は、カロリー制限によって引き起こされる特徴的な代謝変化である。マウスにカロリー制限を行うとエネルギー源が炭水化物から脂肪にシフトすると同時に、骨格筋や肝臓においてオートファジーが顕著に活性化する(Mizushima, *Mol Biol Cell*, 2004)。加えて、極端に大量の脂質を培養細胞に振り掛けた場合や長期間に渡りマウスに高脂肪食を与え続けた場合にはオートファジーが抑制されるものの(Singh et al, *Nature*, 2009)、一過性の脂質投与により培養細胞を刺激するとオートファジーの顕著な活性化が観察される(Singh and Cuervo, *Cell Metab*, 2011)。これらの先行研究は、脂質がオートファジーの重要な制御因子と成り得る可能性を示している。

(3) カロリー制限と同じように、身体運動もまた脂質代謝を大きく変化させるための手段となる。一口に運動と言っても、脂質代謝への依存の程度が運動強度によって大きく異なる。強度の低い運動はエネルギー供給を脂肪に依存する割合が高いが、強度の高い運動は脂肪の利用は抑えられ炭水化物依存に移る。すなわち、低強度での長時間運動は、“脂質代謝が最大限に亢進する運動”と言える。筆者らは、低強度の有酸素運動運動が、体重や体脂肪率の減少がみられない場合でさえも、全身や筋肉におけるインスリン作用の増加(改善)、炎症性サイトカインの血中濃度の低下(改善)、HDL(善玉)コレステロールの増加などの多くの有益な効果を発揮することを実証してきた。最近、Heらにより(He et al, *Nature*, 2012)、一過性の運動によるインスリン作用の改善に骨格筋におけるオートファジーの活性化が必須であるということが証明されたが、運動誘発性オートファジーの活性化(運動直後にみられるオートファジーの活性化)に運動中の脂質代謝亢進が関与しているかどうかや、オートファジーを最も効果的に活性化する運動条件については全くわかっていない。本研究では、脂質代謝への依存度が高い低強度運動によりオートファジーが最も大きく活性化するとの仮説を検証するために実施した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、脂質代謝への依存度の高い低強度運動と、脂質代謝への依存度が低い(糖代謝への依存度が高い)高強度運動で、骨格筋・肝臓等の組織におけるオートファジーの活性化を比較・検討することにより、オートファジーを効果的に活性化する運動条件を明らかにすること、また、運動誘発性オートファジー活性化の機序を探求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LC3(microtubule-associated protein light chain 3)は、オートファジーの活性化(オートファゴソームと呼ばれるオートファジーの誘導に必要な構造の形成)に必要なタンパク質であり、オートファジー活性化の信頼性の高いマーカーとして認められている。すなわち、LC3が誘導されれば、オートファジーが活性化しているとみなすことができる。本研究では、運動誘発性のオートファジー活性化(運動後のオートファジーの活性化)を評価するために、LC3が誘導されると蛍光(Green Fluorescent Protein [GFP]による緑色蛍光)を発するように遺伝

子改変されたトランスジェニックマウス (GFP-LC3 マウス) を用いた。運動による脂質代謝への依存度 (亢進の度合い) が異なる以下の2つの運動条件 (低強度運動群と高強度運動群) とコントロール群を設けた。平均で20月齢 (ヒトにおいて運動が特に必要となる年齢を考慮して高齢マウスを用いた) のGFP-LC3雄マウス ($n = 28$) を以下の3つのグループにランダムに振り分けた。絶食時間はいずれの条件も6~7時間とした。

90分間の低強度トレッドミル運動 (分速10m、走行距離900m)

60分間の高強度トレッドミル運動 (分速15m、走行距離900m [走行距離はと同じ])

コントロール (運動なし)

と の運動を行う条件では、小動物用エネルギー代謝測定システム (ARCO-2000, アルコ社製) を用いて、トレッドミル運動中の酸素摂取量、呼吸商 (二酸化炭素排出量を酸素摂取量で除した値) 脂質燃焼量、炭水化物燃焼量、エネルギー消費量を測定した (トレッドミルランニング中の最後の30分の平均値をデータ解析に使用)。これらの条件の実験を行う前に、8-12 m/minでのトレッドミルランニング15分を2回行い、トレッドミル運動に馴化させた (この馴化のためのトレッドミル運動の影響を取り除くために、2回目の馴化から3日後に実験を行った)。いずれの条件においても、イソフルラン麻酔下において、腓腹筋、肝臓、ヒラメ筋、脳 (海馬を含む脳全体) 血液を採取し、組織化学分析用 (GFPの緑色蛍光測定用、4%パラホルムアルデヒドで固定後、スクロース処理し、その後包埋) と生化学分析用 (オートファジー関連のRNA・タンパク質分析用、RNA later で処理) に適切に処理し、その後凍結保存した。

(2) 組織化学分析用の試料 (腓腹筋、肝臓) は、凍結切片作製装置 (クリオスタット NX50) を用いて切片 (厚さ $7\mu\text{m}$) を作成し、蛍光顕微鏡 (AxioImagerM2, Zeiss 社製) でGFPの緑色蛍光を撮影した。次に、専用の蛍光画像解析ソフト (Zen Blue, Zeiss 社製) を用いてGFPの緑色蛍光を定量化した (全細胞面積あたりの緑色蛍光ドット面積の割合で評価した [この値が高ければ高いほど、オートファジーが活性化していることを示す])。統計解析に関しては、統計解析ソフト SAS を使用して、群間比較には対応のない t 検定、相関解析にはピアソンの相関係数を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 運動なし群 ($n=10$)、低強度運動群 ($n=9$)、高強度運動群 ($n=9$) の体重は、それぞれ平均で 38.2g 、 35.1g 、 39.3g であり、有意な差は見られなかった。低強度運動群と高強度運動群の酸素摂取量 (3.32 ± 0.28 versus 3.65 ± 0.33 ml/min) とエネルギー消費量 (15.8 ± 1.1 versus 17.6 ± 1.7 cal/min) は、高強度運動群で高い傾向にあった。また、低強度運動群と高強度運動群の呼吸商 (0.77 ± 0.06 versus 0.81 ± 0.06) 脂質燃焼量 (1.31 ± 0.47 versus 1.15 ± 0.37 mg/min) 炭水化物燃焼量 (7.03 ± 1.26 versus 7.19 ± 0.89 mg/min) については、統計的な有意差は認められなかったものの、高強度運動と比較して低強度運動の方が脂質代謝への依存度が高いことが示された。

(2) GFPの緑色蛍光により評価した肝臓におけるオートファジー活性化は、コントロール群 (平均 \pm 標準偏差: $13.2 \pm 4.9\%$) と比較して、低強度運動群 ($14.8 \pm 4.2\%$) では差が見られなかったが ($P = 0.48$)、高強度運動群では統計的に有意に高値を示した ($21.1 \pm 5.2\%$, $P = 0.003$)。一方、腓腹筋におけるオートファジーの活性化に関しては、コントロール群 ($0.28 \pm 0.15\%$) と比較して、低強度運動群 ($3.3 \pm 2.3\%$) で有意に高値を示したが ($P = 0.0008$)、高強度運動群における増加は統計的に有意に届かなかった ($1.62 \pm 3.0\%$, $P = 0.17$)。

(3) 低強度及び高強度運動群を対象として、運動中の代謝指標とオートファジー活性化指標の相関関係を解析した結果、酸素摂取量と肝臓におけるオートファジー活性化の間に正の相関関係が認められた ($r = 0.56$, $P = 0.02$)。一方、そのような相関関係は腓腹筋においては認められなかった。加えて、運動中の脂質代謝指標 (呼吸商、脂質燃焼量) と肝臓及び腓腹筋のオートファジー活性化の間に、統計的に有意な相関関係は認められなかった。

(4) 本研究により、高強度運動 (比較的短時間) では肝臓のオートファジーの活性化が促され、一方、低強度運動 (比較的長時間) により腓腹筋のオートファジー活性化が引き起こされることが分かった。これらの結果から、骨格筋のオートファジー活性化には低強度運動の方が、肝臓のオートファジー活性化には高強度運動の方が効果が高い可能性が示唆された。したがって、腓腹筋の結果に関しては、上述の仮説が一部支持されたと言える。しかし、運動中の脂質代謝指標とオートファジー活性化の間にはっきりとした相関関係は認められず、運動誘発性オートファジー活性化の機序の解明までは到達できなかった。今後は更に、既に凍結保存されているヒラメ筋と脳のオートファジー活性化の評価を加えて、その結果に応じて必要な生化学分析を行い、学会発表と論文作成を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	見市 文香 (三田村文香) (Mi-ichi Fumika) (70576818)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	