

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01838

研究課題名(和文)メタボリック症候群に伴う炎症に対する運動療法の効果 年代別の遺伝子学的検討

研究課題名(英文) Effects of exercise for inflammation associated with metabolic syndrome; genetic analysis for middle-aged mice

研究代表者

岡田 恭司 (Okada, Kyoji)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10185431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：7週齢の雄C57BL/6Jマウス32匹を普通餌で30週齢まで観察し、30週齢より脂肪分を14%含有する高脂肪食による肥育を6週行い、36週の時点でIPGTTを実施し、全マウスで軽～中等度の耐糖能異常を確認した。36週よりマウスを高脂肪食で運動負荷を行うA群、普通餌で運動負荷を行うB群、普通餌で運動なしのC群、高脂肪食で運動なしのD群の4群に無作為に分け、44週まで観察した。44週のIPGTTではB群とC群では改善が認められた。B群とC群の間では有意な差は見られなかった。マイクロアレイでは、A群とD群でTraj37, Tcrg-V4などTcellを介する炎症系の遺伝子の有意な発現が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中高年ではメタボリック症候群が多く、その対処法は喫緊の問題である。メタボリック症候群では運動療法の有効性が述べられているが、その遺伝子学的効果は不明の点が多く、特にメタボリック症候群の多い中高年では動物実験はいまだに行われていない。そこで中高年マウスを対象に軽～中等度の耐糖能異常マウスを作成し、運動の夜効果を遺伝子学的に検討した。その結果、運動を行うことにより、耐糖能異常の改善とT細胞を介する炎症反応が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Thirty-two 7 week-old C57BL/6J mice were enrolled and observed until 30 weeks under the general diet. Then, high fat diet including 14% fat material were provided to these mice until 36 weeks, and IPGTT at the 36 weeks confirmed that all mice had low or moderate -grade glucose intolerance condition. Mice were divided into the 4 groups during 36 to 44 weeks as follows: A group, continuous high-fat diet administration with exercise 3 days per week; B group, general diet with exercise; C group, general diet without exercise; D group, high fat diet without exercise. At the 44 week, IPGTT showed better results in B and C groups. No significant difference was found between the B and C groups. Microarray of the skeletal muscle showed significant higher expression of T cell-mediated inflammatory genes such as Traj37, Tcrg-V4Tcell.

研究分野：内部障害に対する運動療法

キーワード：メタボリック症候群 運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 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。われわれも運動頻度が中程度の、強度も中程度の運動負荷が壮年期メタボリック症候群マウスに対し有効性が高いことをこれまでの科研費による研究で明らかにしてきた。一方、メタボリック症候群は成人の中でも中高年層に多く、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。特に高齢化の進む現状では初老期のメタボリック症候群モデルに対する研究が急務と言える。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、我々のこれまでの研究も壮年期のメタボリック症候群モデルマウスを対象としたものであり、初老期のマウスを用いた運動療法の研究が求められる。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。さらにメタボリック症候群では肝臓への脂肪沈着と脂肪組織周囲の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が、上記の肝臓や脂肪組織の炎症に対してどのような効果を有しているか、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肝臓やそこに沈着した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初老期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。さらにメタボリック症候群の治療では運動療法とともに厳格な食事療法が推奨されている。しかし厳格な食事療法に対し、適当と言われている運動療法がどの程度のインパクト(有効性)を有しているかは明らかでなく、遺伝子レベルでの検討も行われていない。以上述べたように、メタボリック症候群に対する運動療法の研究における現状の問題点は、初老期のメタボリック症候群での肝臓や脂肪組織の炎症に対する効果が遺伝子的に明らかにされていない点、食事療法に比しての効果の強さが遺伝子的に明らかにされていない点であると言える。

## 2. 研究の目的

初老期のメタボリック症候群モデルマウスに対する運動療法の効果を遺伝子的に明らかにし、特に肝臓や脂肪組織における炎症反応に対する遺伝子レベルの反応を明らかにすること。さらには食事療法に比べて、中等度の頻度と強度をゆうする運動療法の効果がどの程度なのかを遺伝子的に明らかにすること

## 3. 研究の方法

### (1) 初老期の脂質異常、耐糖能異常モデルマウスの作成

7週齢の雄 C57BL/6J マウス(日本クレア社)32匹を、それぞれ独立した小ケージで飼育した。実験開始から 30 週齢まで餌は普通餌、水は同一で自由摂取、自由運動とし、体重、摂餌量を 7 日間隔で測定した。明暗周期は 12 時間とし、明 7:00-19:00、暗 19:00-7:00 で飼育した。室温も 22-24 度で一定とした。全マウス 32 匹とも 30 週齢まで体重、摂餌量、運動の様子など問題なく経過した。30 週齢より脂肪分を 14%含有する高脂肪食 (Western 飼料、オリエンタル酵母社製)による肥育を開始した。29 年度に行ったマウスによる実験では、肥育を 8 週間行っていたが、耐糖能異常の程度が強すぎ、マウスの健康状態が全般的に不良となり、3 匹自然死したため、30 年度は肥育期間を 6 週に短縮した。

## (2) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) IPGTT

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 は運動期間前の 36 週と運動期間終了時の 44 週の時点で 2 回行った。

## (3) 肥育モデルマウスの群わけと、トレッドミルによる運動負荷

肥育したマウス 32 匹を高脂肪食継続で運動負荷(小動物用を用い、マウスの 65%V02Max の条件である 5 度傾斜、速度 10 m/s 20 分間で週 3 回実施)を行う A 群、普通餌に変更し上述の運動負荷を行う B 群、普通餌で運動なしの C 群、高脂肪食で運動なしの D 群の 4 群(各群 8 匹)に無作為に分けた。

(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、その後にロッドを定速で回転させ、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の 36 週と運動期間後の 44 週に 2 回行った。

(5) 組織採取 運動期間が終了した時点で、頸椎を脱臼させてから肝臓と大腿四頭筋を採取し、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

採取した肝臓組織をマイクロトームで 4 μm に薄切し、通常の HE 染色を行い、脂肪の沈着程度や炎症の状態を確認した。

## (7) DNA microarray による解析

前項で凍結保存した骨格筋組織から RNA を抽出し、DNA microarray を行い、遺伝子の発現を群間で比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 肥育終了(運動負荷前)時(36 週)時の結果

IPGTT で、全 32 匹のマウスで糖負荷後 60 分と 120 分の血糖値の高値が見られ、軽~中等度の耐糖能異常がを有する適切なメタボリック症候群モデルマウスであることを確認した。ロタロッドシステムによる運動能の解析では、同年齢のマウス標準値にくらべ有意な低下が認められた。

### (2) 運動負荷終了時(44 週時)の結果

普通餌に変更し 8 週間経過していた B 群と C 群では体重と運動能が高脂肪食を継続した A 群と D 群に比べ有意に良好であった。IPGTT でも、B 群と C 群で糖負荷後 60 分と 120 分の血糖値の改善が見られた。A 群と D 群では改善が見られなかった。B 群と C 群間、A 群と D 群間では差が見られなかった。すなわち運動の効果は明らかでなく、食事の影響が強かった。組織学的にも同様で、普通餌に変更し 8 週間経過していた B 群と C 群では肝臓内の脂肪沈着と炎症細胞の浸潤、さらには線維化の程度が、高脂肪食を継続した A 群と D 群に比べ有意に良好であった。DNA microarray では遺伝子 21 個の高発現が高脂肪食を継続した A 群と D 群で観察された。中でも Traj37, Tcrg-V4, Traj22T など T cell を介する炎症系の遺伝子の有意な発現が認められた(表 1)。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も、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。

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	木元 稔  (Kimoto Minoru)  (40759586)	秋田大学・医学系研究科・助教   (11401)	
研究分担者	齊藤 明  (Saito Akira)  (90591751)	秋田大学・医学系研究科・助教   (11401)	