

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06423・19K21499

研究課題名(和文) 運動による動脈硬化度の軽減に関するアディポカインの同定と分子機序の解明

研究課題名(英文) Identification of adipokines involved in reducing arterial stiffness by exercise training, and elucidation of molecular mechanisms

研究代表者

長谷川 夏輝 (Hasegawa, Natsuki)

立命館大学・総合科学技術研究機構・研究員

研究者番号：00822850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、有酸素性トレーニングにより分泌変動するアディポカインの産生部位の同定と動脈血管への影響を検討した。肥満モデルマウスを対象に有酸素性トレーニングを実施した結果、脂肪重量の低下に伴って精巣上体脂肪におけるadiponectinおよびCTRP3 mRNA発現は有意に増加し、血管内皮機能は有意に向上した。さらに、有酸素性トレーニングを行ったマウスの精巣上体脂肪を安静対照マウスに移植した結果、動脈血管内の脂肪沈着面積は有意に低下した。これらに結果から、有酸素性トレーニングによる特定の脂肪組織からのadiponectinおよびCTRP3発現の増加は動脈硬化度の低下に関連している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、習慣的な運動により局所的に存在する脂肪組織から産生されるアディポカイン：CTRP3が動脈血管に作用することを明らかにしたことで、「臓器間のネットワーク」による新たな運動効果の機序を提案することができる。また、全身のどこに蓄積する脂肪を改善させることが動脈硬化に対して効果的なのかを明らかにすることで、将来的には、肥満患者における心血管系疾患リスクの増大の予防・改善のための科学的な根拠に基づく運動プログラムの構築への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the identification of adipokines involved in reducing arterial stiffness by exercise training. Obesity model mice were divided into sedentary control and aerobic exercise training (voluntary wheel running) groups. Aerobic exercise training significantly increased adiponectin and CTRP3 mRNA expression in epididymal adipose tissue, and significantly improved endothelial function. Additionally, transplantation of epididymal fat from aerobic-trained mice into sedentary control mice revealed that reduction of arterial stiffness. These results suggest that the aerobic exercise training-induced increase in the production of adiponectin and CTRP3 from local adipose tissues may be associated with a reduction in arterial stiffness.

研究分野：運動生理・生化学

キーワード：アディポカイン 動脈硬化 脂肪 有酸素性トレーニング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、国内では心疾患、脳血管疾患などの動脈硬化を起因とする死亡原因が 26%程度占めており、欧米では心疾患が第一位であることから、いかにして、動脈硬化の予防やそのリスクを軽減させるかが重要な課題となっている。動脈硬化性心血管疾患が引き起こされる原因の一つとして、体内の過剰な脂肪蓄積(肥満)が関与している。体内の脂肪蓄積は、内臓や皮下脂肪だけでなく、心臓や肝臓、骨格筋内にも蓄積し、これらの脂肪蓄積は内臓脂肪と同様に動脈硬化度の悪化に重要であるということ(Hasegawa N et al, Am J Hypertens 2015; Choi TY et al, Atherosclerosis 2013; Chen JY et al, J Am Soc Hypertens 2012), また有酸素性トレーニングによってそのリスクが改善されることが報告されている(Hasegawa N et al, J Hum Hypertens 2016)。さらに、運動による動脈硬化度低下の機序として、脂肪の減少により脂肪細胞から産生されるアディポカインと総称される生理活性物質が血液を介して動脈血管に作用することが関与する可能性が示され、adiponectin が有力であることが報告されてきている(Lee S et al, Am J Physiol 2011)。近年、adiponectin と共通の遺伝子配列を持つ新規アディポカインとして 15 種類の C1q/TNF-related protein (CTRP) が同定され、有酸素性トレーニングによる動脈硬化度低下の機序に抗炎症作用を有する adiponectin, CTRP3, CTRP5 の血中濃度の増加が関与する可能性が示唆されている(Hasegawa N et al, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2018)。しかしながら、有酸素性トレーニングによる血中 CTRPs 濃度の増加は、全身のどこに蓄積された脂肪から分泌されているものを反映しているのかについては明らかでない。また、有酸素性トレーニングによって脂肪組織からの CTRPs 分泌が亢進していることが、動脈硬化度の低下にどの程度寄与しているかも解明されていない。

### 2. 研究の目的

有酸素性トレーニングにより分泌増大する CTRPs がどこの脂肪組織から分泌するのか、また、CTRPs 分泌増大が動脈硬化度の低下におよぼす影響について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 研究課題 : 運動によって分泌増大する CTRPs (adiponectin, CTRP3, CTRP5) がどこの脂肪組織から分泌するのかの同定

#### 対象

38 週齢の Senescence-accelerated mouse prone 1 マウス 17 匹を対象とし、安静対照群 (Con 群) 7 匹、有酸素性トレーニング群 (AT 群) 10 匹に分け、50 週齢時に解剖した。

#### 実験手順

AT 群は最終の有酸素性トレーニングの 48 時間後に体重測定を行い、イソフルラン (0.1ml/kg) による吸引麻酔後、頸椎脱臼により安楽死処置し、精巣上体脂肪、肩甲下皮下脂肪、大動脈血管周囲脂肪、肩甲下褐色脂肪、大動脈血管を摘出した。各サンプルは、冷生理食塩水にて洗浄し、付着している血液を取り除き、組織重量を測定した。

#### 有酸素性トレーニング

AT 群は回転車輪を用いた自発走運動による 12 週間の有酸素性トレーニングを個別ケージにて行った。

#### 摘出大動脈輪を用いた血管拡張能

動脈血管の血管拡張度の指標として、ミオグラフ (Danish Myo Technology A/S 社製, Aarhus N, Denmark) を用いて測定した。マウスから胸部大動脈を血管内皮細胞が損傷しないように摘出した後、2mm の長さに切断し、大動脈輪として血管標本作製した。作製された血管標本は、95%O<sub>2</sub> と 5%CO<sub>2</sub> で灌流された 37 °C の Krebs Buffer (NaCl: 130mM, KCl: 4.7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.18mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 1.18mM, NaHCO<sub>3</sub>: 14.9mM, Glucose: 5.5mM, EDTA: 0.026mM, CaCl<sub>2</sub>: 1.16mM) インキュベーション中にチャンパー内の張力測定用のワイヤーにセットした。血管標本に対して 300nM の U-46619 (Prostaglandin F<sub>2</sub>, Cayman Chemical 社製, Ann Arbor, MI, USA) で刺激し、最大収縮を確認した後、血管弛緩作用を有する 10<sup>-9</sup>M ~ 10<sup>-4</sup>M アセチルコリン (Acetylcholine: ACh) を添加し、血管弛緩反応を濃度依存曲線で表し、血管拡張反応を評価した。

#### Adiponectin, CTRP3, CTRP5 遺伝子発現量

摘出してきた精巣上体脂肪、肩甲下皮下脂肪、大動脈血管周囲脂肪、肩甲下褐色脂肪の一部 (約 20mg) から total RNA を ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いて抽出した。RNA は OmniScript reverse transcriptase (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて逆転写し、各組織の adiponectin, CTRP3, CTRP5 mRNA 発現は TaqMan Gene Expression assay (adiponectin: assay ID

Mn00456425\_m1, Applied Biosystems 社製, Foster City, CA, USA; CTRP3: assay ID Mn00473047\_m1, Applied Biosystems 社製; CTRP5: assay ID Mn04204561\_gh, Applied Biosystems 社製) を用いて real-time PCR 法により解析した。

#### 統計処理

本研究結果は、すべて平均値 ± 標準誤差で表した。CON 群および AT 群の 2 群間の各測定項目の比較は、対応のない t 検定を実施した。血管拡張能における 2 群間の比較は二元配置共分散分析を行い、主効果を検討した。すべての統計解析は StatView 5.0 (SAS 社製) を使用した。危険率 (P) は 5% 未満を有意水準とした。

## (2) 研究課題 : 運動による脂肪組織の CTRPs 分泌増大が動脈血管に与える影響の検討 対象

8 週齢の apolipoprotein E (ApoE) 遺伝子欠損マウス 31 匹を対象とし、16 週間の高脂肪食摂取による安静対照群 (Donor-Con 群)、16 週間の高脂肪食摂取に加えて有酸素性トレーニング (自発的回転車輪運動) を行う群 (Donor-Ex 群)、12 週間の高脂肪食摂取による安静飼育後に Donor-Con 群の精巢上体脂肪を腹腔に移植して 4 週間安静飼育を行う群 (Recipient-Con 群)、12 週間の高脂肪食摂取による安静飼育後に Donor-Ex 群の精巢上体脂肪を腹腔に移植して 4 週間安静飼育を行う群 (Recipient-Ex 群)、12 週間の高脂肪食摂取による安静飼育後に開腹のみを行い、閉腹して 4 週間安静飼育を行う群 (Sham: 擬似手術群) に分け、24 週齢時に解剖した。

#### 実験手順

Donor マウスは飼育期間中、41% 脂質含有の高脂肪食を付加し、水およびエサは自由摂食・飲水とする。運動群においては、自由回転車輪を用いた運動を 8 週齢より開始し 16 週間 (24 週齢まで) 実施する。最終の有酸素性トレーニングの 48 時間後に体重測定を行い、イソフルラン (0.1 ml/kg) による吸引麻酔後、頸椎脱臼により安楽死処置し、精巢上体脂肪、大動脈血管を摘出した。各サンプルは、冷生理食塩水にて洗浄し、付着している血液を取り除き、組織重量を測定した。また、摘出してきた各脂肪組織はレシピエントマウスに移植するまで 37 °C の生理食塩水にインキュベートする。

Recipient マウスは 41% 脂質含有の高脂肪食摂取による 12 週間の安静飼育後、イソフルラン麻酔下にて腹部を開腹し、Donor マウス (運動群もしくは安静群) から採取した精巢上体脂肪組織を 100 mg 程度、Recipient マウスの精巢上体脂肪に上乘せするように移植した後、10% ポビドンヨード液で消毒し、縫合を行う。移植後は、抗生物質の自由飲水による 4 週間の安静飼育の後、イソフルラン (0.1 ml/kg) による吸引麻酔後、頸椎脱臼により安楽死処置を行い、解剖を実施した。

#### 有酸素性トレーニング

有酸素性トレーニング群は回転車輪を用いた自発走運動による 12 週間の有酸素性トレーニングを個別ケージにて行った。

#### 動脈血管の脂肪沈着

動脈血管は下行大動脈から腹部大動脈の分岐部までを摘出し、周囲の脂肪を摘出した後に 10% 中性緩衝ホルマリン液で室温にて 24 時間以上固定し、60% Oil Red O 溶液で 37 °C にて 20 分間インキュベートした。インキュベート後、60% イソプロパノールを用いて洗浄したものを血管標本とし、マクロレンズを装着したデジタルカメラを用いて各動脈血管を撮影し、動脈血管総面積あたりの血管内脂肪沈着部位の割合を Image J ソフトウェア ver 1.48 (NIH 社製) を用いて測定した。

#### 統計処理

本研究結果は、すべて平均値 ± 標準誤差で表した。Donor-Con 群および Donor-Ex 群の 2 群間の各測定項目の比較は、対応のない t 検定を実施した。また、Recipient-Con 群、Recipient-Ex 群、Sham 群の各群間における動脈血管の脂肪沈着面積の比較は、一元配置分散分析法により検定し、交互作用が認められた場合には、Fisher の PLSD 法を用いて post-hoc 検定を実施した。すべての統計解析は StatView 5.0 (SAS 社製) を使用した。危険率 (P) は 5% 未満を有意水準とした。

## 4. 研究成果

### (1) 研究課題

Con 群と比較して AT 群の体重および精巢上体脂肪重量は有意に低値を示した。また、摘出した大動脈血管より作製した血管標本に対して血管内皮依存性血管弛緩作用を有するアセチルコリンを  $10^{-4}M \sim 10^{-9}M$  まで濃度依存的に添加した結果、Con 群、AT 群ともに有意な血管拡張作用は

認められたが、AT 群の血管拡張率は Con 群よりも有意に高値を示した。

精巣上体脂肪の adiponectin mRNA 発現は、Con 群と比較して AT 群で有意に高値を示した。また、精巣上体脂肪の CTRP3 遺伝子発現は、Con 群と比較して AT 群で有意に高値を示したが、肩甲下皮下脂肪、大動脈血管周囲脂肪、肩甲下褐色脂肪においては、Con 群と AT 群との間に有意差は認められなかった。さらに、CTRP5 遺伝子発現は、精巣上体脂肪、肩甲下皮下脂肪、大動脈血管周囲脂肪、肩甲下褐色脂肪いずれにおいても Con 群と AT 群との間に有意差は認められなかった。

## (2) 研究課題

体重および精巣上体脂肪重量は Donor-Con 群と比較して Donor-EX 群で有意に低値を示した。動脈血管の脂肪沈着面積は、Donor-Con 群と比較して Donor-EX 群で有意に低値を示した。また、Recipient マウスにおいて、体重および精巣上体脂肪重量には群間に有意な差は認められなかったが、動脈血管の脂肪沈着面積は、Recipient-Con 群および Sham 群と比較して Recipient-Ex 群で優位に低値を示した。

これらの結果から、示された。有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下には、局所的な脂肪蓄積の変化が関与し、そのメカニズムには局所に蓄積する脂肪からの CTRPs (adiponectin および CTRP3) 分泌が関与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 長谷川夏輝, 藤江隼平, 堀居直希, 内田昌孝, 家光恵子, 浜岡隆文, 家光素行.
2. 発表標題 老齡マウスの有酸素性トレーニングは脂肪組織のCTRP3遺伝子発現を増大させる.
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasegawa N, Fujie S, Horii N, Uchida M, Iemitsu K, Sanada K, Hamaoka T, Iemitsu M.
2. 発表標題 Aerobic exercise training-induced changes in anti-inflammatory adipokines secretion from local source are related to reduction of arterial stiffness in elderly.
3. 学会等名 American Heart Association scientific sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasegawa N, Horii N, Fujie S, Uchida M, Sanada K, Hamaoka T, Iemitsu M.
2. 発表標題 Serum C1q level is a novel biomarker of cardiovascular diseases risk.
3. 学会等名 11th international SCWD conference on cachexia, sarcopenia and muscle wasting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasegawa N, Horii N, Fujie S, Uchida M, Sanada K, Hamaoka T, Iemitsu M.
2. 発表標題 Habitual aerobic exercise-induced decrease in circulating C1q level is associated with reduction of cardiovascular diseases risks in the elderly.
3. 学会等名 Epidemiology and Prevention   Lifestyle and Cardiometabolic Health 2019 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----