

機関番号：32610

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008~2010

課題番号：20700528

研究課題名 (和文) 運動は肥大した脂肪細胞のアドレナリン受容体の代謝回転をどのように調節するのか

研究課題名 (英文) What is the mechanism underlying the turnover of  $\beta$ -adrenergic receptor on hypertrophied primary adipocytes ?

研究代表者

小笠原 準悦 (OGASAWARA JUNETSU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20415110

研究成果の概要 (和文) : 非肥満ラットに中強度の急性走運動を施し、脂肪細胞膜上の  $\beta$ -アドレナリン受容体 ( $\beta$ -AR) 発現の変化について検討したところ、運動中から運動後数時間は  $\beta$ -AR の発現が有意に増加し、これは  $\beta$ -AR の内在化に関与するタンパク質群のユビキチン化により調節されることが明らかとなった。脂肪細胞における  $\beta$ -AR の主な生理作用は脂肪分解反応の活性化である。しかし、 $\beta$ -AR の挙動は必ずしも非肥満個体と肥満個体の脂肪細胞で一致しない報告があり、肥大した脂肪細胞の  $\beta$ -AR の発現変化については依然としてブラックボックスが存在している。そこで、本研究では肥満に伴い肥大した脂肪細胞の細胞応答性について、 $\beta$ -AR の代謝回転機構に焦点を当て検討した。

研究成果の概要 (英文) : The purpose of the current study is to investigate the trafficking of  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR) can regulate the lipolysis in high fat diet-induced hypertrophied adipocytes (HA) that are observed in obese mammals. The animals (C57BL/6J mice) were randomly divided into two groups: a normal diet intake and high fat diet intake, and adipocytes were isolated from epididymal adipose tissue. Low concentration (10 nM) of Isoproterenol (ISO)-stimulated lipolysis was significantly elevated in HA than that in non hypertrophied control (NHC) cells. In contrast, lipolysis in HA was significantly attenuated in high concentration (1  $\mu$ M) of ISO compared with NHC. Under this condition, in membrane fraction, the levels of  $\beta_2$ -AR was significantly reduced in HA compared with NHC, accompanied by increased levels of  $\beta$ -arrestin-2 and  $\beta_2$ -AR /  $\beta$ -arrestin-2 complex, which are accelerator of agonist-induced trafficking of the  $\beta_2$ -AR from plasma membrane to cytosol. These results suggest that trafficking i. e., internalization of  $\beta_2$ -AR, with high concentration of ISO would be associated with reduced levels of lipolytic response in HA, and that this phenomenon is one of the mechanism underlying lower levels of fat metabolism in obese mammals in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：白色脂肪細胞、脂肪分解反応、運動、

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、通常のラットより単離した脂肪細胞を用いて、長らく不明であった、運動時のエネルギー代謝や細胞の機械的応答と密接に関与する  $\beta$ -アドレナリン受容体 ( $\beta$ -AR) の運動による発現変化は、ユビキチン-プロテアソーム系による修飾作用により調節されることを見出し、これは  $\beta$ -AR 経路の下流に存在する情報伝達分子の発現変化や、細胞の生理的応答と一致することを報告している。脂肪細胞における  $\beta$ -AR 経路の主な生理作用は、脂肪分解経路の調節にあることから、 $\beta$ -AR の挙動とアダプター分子の発現変化は、肥大した脂肪細胞の脂肪分解反応の調節においても重要な役割を果たすと考えられる。事実、運動による脂肪細胞の脂肪分解反応の有意な亢進は、肥満者の脂肪細胞でも観察されるが、肥満個体より単離した脂肪細胞のアドレナリン受容体の挙動は、必ずしも非肥満個体より単離された脂肪細胞にみられる細胞応答や局在変化と一致しないようである。

## 2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの新たな治療方法や予防方法の確立には、運動が惹起する細胞の機械的応答の生理・生化学的な変化を科学的に理解することが重要である。そこで本研究では、脂肪代謝の中核をなす脂肪細胞を試料として、肥満に伴い肥大した脂肪細胞の細胞応答性に焦点を当て、運動刺激によるアドレナリン受容体の代謝回転機構について検討した。

## 3. 研究の方法

### ①実験動物と運動負荷

実験には C57BL/6L マウス (6 週齢より飼育開始) を用いた。マウスはランダムに通常食摂取群 (C 群) と高脂肪食摂取群 (H 群) に分けた。高脂肪食として、60% カロリー比高脂肪飼料を 16 週間投与した。急性運動として、10 m/分、60 分間のトレッドミル走行を実施した。

### ②脂肪細胞の調製と脂肪分解反応の測定

C 群および H 群マウスより副睾丸脂肪組織を摘出し、既報 1) に準じて脂肪細胞を単離した。単離した脂肪細胞を 1 mg / ml のコラゲナーゼ type1 と 200 nM のアデノシンを含む Krebs リン酸緩衝液に浮遊させ、37 °C の恒温条件下で 30 分間インキュベートした。 $\beta$ -AR の活性化とその生理作用の指標として、インキュベーションメディアウム内に放出されたグリセロール量 (脂肪分解反応) を測定した。

### ③細胞分画の調製とタンパク質発現の検討

上述の細胞を回収後、プロテアーゼ阻害剤

と脱リン酸化酵素阻害剤を含む細胞質画分用緩衝液 (ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit, EMD Bioscience, Inc.) とホモジナイズし、遠心の後細胞質画分を得た。同様に、回収された沈渣を細胞膜画分用緩衝液で処理することにより、細胞膜画分を得た。両画分におけるタンパク質の発現はウエスタンブロット法を用いて検出した。タンパク質間の結合は免疫沈降法により検出した。

## 4. 研究成果

### ①高脂肪食摂取による形態的变化と細胞径

H 群の体重と体重あたりの副睾丸脂肪組織量は、C 群と比べて有意に増加した (表 1)。H 群では大型化した脂肪細胞が多数認められた (図 1)。C 群と比べて H 群の血中レプチン濃度は有意に高かった (表 1)。H 群は脂肪組織の増加と脂肪細胞の大型化を伴った肥満であることが確認された。

表1 通常食摂取群(C群)と高脂肪食摂取群(H群)の体重、脂肪組織量および血中レプチン濃度

	C群	H群
体重(g)	35.0±5.6	54.6±2.7 *
副睾丸周囲脂肪組織(g)	0.4±0.3	1.4±0.1 *
体重あたりの副睾丸周囲脂肪組織(%)	1.1±0.7	2.6±0.3 *
血中レプチン(ng/ml)	17.3±2.5	110.4±1.7*

各群n = 7, 平均±SD, \* p < 0.05 vs. C群

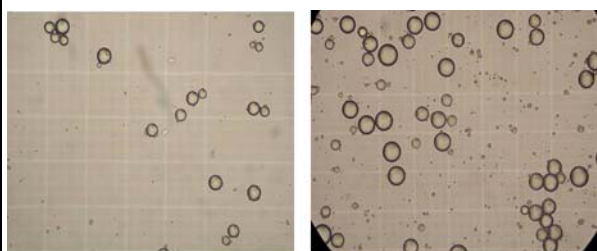


図1 通常食および高脂肪食摂取マウスの白色脂肪細胞

通常食摂取群(左)に比べて高脂肪食摂取群(右)では細胞径の肥大化がみられる

### ②脂肪分解反応と $\beta$ -AR の発現の変化

$\beta$ -AR の生理機能を検討するために、脂肪分解反応について検討した。C 群において、合成カテコールアミンであるイソプロテレノール (1  $\mu$ M) の添加は、非存在下 (Basal) と比べて脂肪分解反応を有意に亢進させた。同様の結果は、H 群においても観察された (図 2A)。H 群の Basal は C 群の Basal と比べて有意に高値を示した。そのため、イソプロテレノール添加による増加率は C 群と比べて H 群

で低かった (図 2B)。そこで細胞膜における  $\beta$ -AR タンパク質の発現について検討したところ、C 群では、Basal に比べてイソプロテレノール刺激により細胞膜の  $\beta$ -AR 発現が有意に増加し、内在化の指標である細胞質画分の  $\beta$ -AR /  $\beta$ -arrestin-2 複合体の発現は有意な低下を示した (図 3)。一方、H 群では、Basal に比べてイソプロテレノール刺激による細胞膜の  $\beta$ -AR タンパク質の発現は有意に低下し、内在化の指標である細胞質画分の  $\beta$ -AR /  $\beta$ -Arrestin-2 複合体の発現は有意に増加した (図 3)。C 群と H 群の Basal における細胞膜の  $\beta$ -AR 発現は、H 群で有意に高かった (図 3A)。

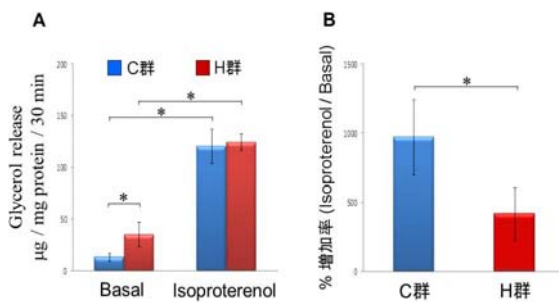


図2 脂肪分解反応 \*P < 0.05

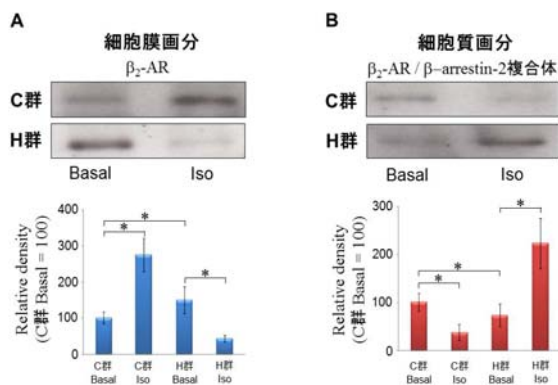


図3  $\beta_2$ -AR発現と $\beta_2$ -AR/ $\beta$ -arrestin-2複合体発現

グラフはC群のBasalバンドの濃度を基準とした両群の2条件下におけるバンドの濃度を示す。値は4回の独立した実験結果を示す。\*P < 0.05

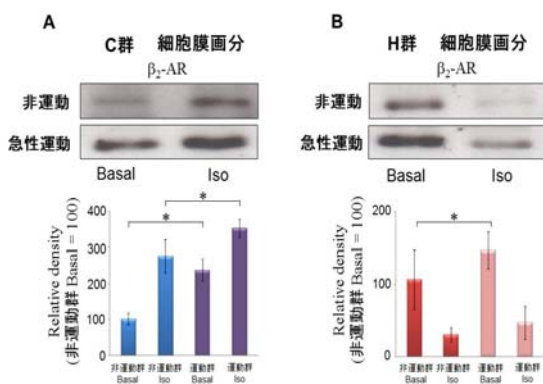


図4 急性運動による $\beta_2$ -AR発現

\*P < 0.05

グラフは非運動群のBasalバンドの濃度を基準としたC群とH群の2条件下におけるバンドの濃度を示す。値は4回の独立した実験結果を示す。

### ③急性運動による $\beta$ -AR 発現の変化

運動による影響を検討するために、両群に 10 m/分、60 分間の急性運動を実施した。非運動時と比べて、C 群、H 群ともにそれぞれ Basal、イソプロテレノール刺激による細胞膜の  $\beta$ -AR 発現は増加した (図 4A、B)。

### 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 13 件)

- (1) J. Ogasawara, K. Kitadate, H. Nishioka, H. Fujii, T. Sakurai, T. Kizaki, T. Izawa, H. Ishida, and H. Ohno, Comparison of the effect of Oligonol, a new lychee fruit-derived low molecular form of polyphenol, and epigallocatechin-3-gallate on lipolysis in rat primary adipocytes, *Phytother. Res.*, 25, 467-471, 2011, 査読有
- (2) J. Ogasawara, S. Nomura, N. Rahman, T. Sakurai, T. Kizaki, T. Izawa, H. Ishida, H. Haga, and H. Ohno, Hormone-sensitive lipase is a critical mediator of acute exercise-induced regulation of lipolysis in rat adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 400, 134-139, 2010, 査読有
- (3) J. Ogasawara, K. Kitadate, H. Nishioka, H. Fujii, T. Sakurai, T. Kizaki, T. Izawa, H. Ishida, and H. Ohno, Oligonol, an oligomerized lychee fruit-derived polyphenol, directly activates Ras/Raf-1/MEK cascade independently of IL-6 signaling pathway in rat primary adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402, 554-559, 2010, 査読有
- (4) D. Hatano, J. Ogasawara, S. Endoh, T. Sakurai, S. Nomura, T. Kizaki, H. Ohno, T. Komabayashi, and T. Izawa, Effect of exercise training on the density of endothelial cells in adipose tissue, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, in press, 2010, 査読有
- (5) S. Miyazaki, T. Izawa, J. Ogasawara, T. Sakurai, S. Nomura, T. Kizaki, H. Ohno, and T. Komabayashi, Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin, *Life Sci.*, 86, 691-698, 2010, 査読有
- (6) T. Sakurai, S. Endo, D. Hatano, J. Ogasawara, T. Kizaki, S. Oh-Ishi, T. Izawa, H. Ishida, and H. Ohno, Effects of exercise training on adipogenesis of

stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue, *Acta Physiol (Oxf)*., 200, 325-338, 2010, 査読有

(7) J. Ogasawara, K. Kitadate, H. Nishioka, H. Fujii, T. Sakurai, T. Kizaki, T. Izawa, H. Ishida, and H. Ohno, Effect of Oligonol, low-molecular form of lychee fruit-derived polyphenol, on lipolysis in primary rat adipocytes, *Phytother. Res.*, 23, 1626-1633, 2009, 査読有

(8) T. Sakurai, T. Izawa, T. Kizaki, J. Ogasawara, K. Shirato, K. Imaizumi, K. Takahashi, H. Ishida, and H. Ohno, Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 605-609, 2009, 査読有

(9) T. Kizaki, K. Shirato, T. Sakurai, J. Ogasawara, S. Oh-ishi, T. Matsuoka, T. Izawa, K. Imaizumi, S. Haga, and H. Ohno,  $\beta$ -Adrenergic receptor regulates Toll-like receptor 4-induced TRIF-dependent late-phase NF- $\kappa$ B activation, *Mol. Immunol.*, 46, 1195-1203, 2009, 査読有

(10) K. Shirato, T. Kizaki, T. Sakurai, J. Ogasawara, Y. Ishibashi, T. Iijima, C. Okada, I. Noguchi, K. Imaizumi, M. Taniguchi, and H. Ohno, Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  suppresses the expression of macrophage scavenger receptor 1, *Pflugers Arch.*, 459, 93-103, 2009, 査読有

(11) H. Ohno, S. Haga, T. Takemasa, T. Sakurai, J. Ogasawara, K. Shirato, Y. Ishibashi, K. Imaizumi, and T. Kizaki, Swimming training prevents induction of suppressor macrophages in mice during acute exposure to cold, *Adv. Exerc. Sports Physiol.*, 15, 1-7, 2009, 査読有

(12) J. Ogasawara, T. Abe, Amino Acid Mixture Identical to *Vespa* Larval Saliva increases both Leptin secretion and basal lipolysis in rat adipocytes, *Food Sci. Technol. Res.*, 14, 95-98, 2008, 査読有

(13) H. Ohno, T. Sakurai, H. Hisajima, S. Abe, T. Kizaki, J. Ogasawara, Y. Ishibashi, K. Imaizumi, T. Takemasa, S. Haga, K. Kitadate, H. Nishioka, and H. Fujii, The Supplementation of Oligonol, the new lychee fruit-derived polyphenol

converting into a low-molecular form, has a positive effect on fatigue during regular track-and-field training in young athlete,

*Adv. Exerc. Sports Physiol.*, 13, 93-99, 2008, 査読有

[学会発表] (計 22 件)

(1) 小笠原準悦, 北館健太郎, 西岡 浩, 藤井 創, 櫻井拓也, 木崎節子, 井澤鉄也, 鈴木健二, 中野法彦, 大野秀樹. 肥満抑制効果を有する Oligonol による脂肪分解反応の調節機構の解明.

第 81 回日本衛生学会学術総会. 東京, (2011.3)

(2) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 石橋義永, 井澤鉄也, 武政 徹, 斎藤大蔵, 小林靖, 芳賀脩光, 大野秀樹. The lipolytic activity in adipocytes differs between normal diet and high fat diet mice via changes in the trafficking of  $\beta$ 2-adrenergic receptor.

第 88 回日本生理学会大会. 東京, (2011.3)

(3) 櫻井拓也, 北館健太郎, 西岡 浩, 藤井創, 小笠原準悦, 木崎節子, 井澤鉄也, 鈴木健二, 中野法彦, 大野秀樹: 運動及び Oligonol の摂取は老化促進モデルマウスの認知機能障害を予防する,

第 81 回日本衛生学会学術総会. 東京, (2011.3)

(4) 小笠原準悦, 北館健太郎, 西岡 浩, 藤井 創, 櫻井拓也, 木崎節子, 井澤鉄也, 長澤純一, 斎藤大蔵, 今泉和彦, 大野秀樹: 脂肪代謝に及ぼす新規低分子化ポリフェノール (Oligonol) の効果と作用機序,

第 4 回学術フロンティア研究発表会. 所沢, (2010.1)

(5) 櫻井拓也, 小笠原準悦, 木崎節子, 石橋義永, 白土 健, 井澤鉄也, 今泉和彦, 鈴木健二, 野口いづみ, 芳賀脩光, 大野秀樹: 運動トレーニングによる肥満・生活習慣病および認知症予防効果とそのメカニズム,

第 4 回学術フロンティア研究発表会. 所沢, (2010.1)

(6) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 井澤鉄也, 鈴木健二, 大石修司, 斎藤大蔵, 人見嘉哲, 芳賀脩光, 大野秀樹: 運動トレーニングによる脂肪細胞の脂肪分解反応と Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) の役割,

第 80 回日本衛生学会学術総会. 仙台, (2010.5) 学術総会会長賞受賞

(7) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 長澤純一, 芳賀脩光, 井澤鉄也, 大野秀樹: 持久的トレーニングによる脂肪細胞の ATGL 発

現の変化と調節メカニズム,  
第 18 回日本運動生理学会大会. 鹿児島,  
(2010. 8)

(8) 櫻井拓也, 小笠原準悦, 木崎節子, 井澤鉄也, 長澤純一, 芳賀脩光, 大野秀樹: 老化促進モデルマウスの認知機能障害に対する運動トレーニングの予防効果,  
第 65 回日本体力医学会大会. 千葉, (2010. 9)

(9) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 木本紀代子, 大野秀樹: 新規低分子化ポリフェノール (Oligonol) による脂肪分解反応の調節メカニズム,  
第 39 回杏林医学会総会. 東京, (2010. 11)

(10) 櫻井拓也, 北舘健太郎, 西岡 浩, 若命浩二, 藤井 創, 小笠原準悦, 木崎節子, 石橋義永, 藤原智徳, 赤川公朗, 人見嘉哲, 芳賀脩光, 大野秀樹: 老化促進モデルマウスの認知機能障害に対する Oligonol の予防効果,  
第 8 回日本予防医学学会学術総会. 金沢, (2010. 12)

(11) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 石橋義永, 井澤鉄也, 鈴木健二, 大河原知水, 大石修司, 長澤純一, 大野秀樹: 急性運動による脂肪細胞の脂肪分解反応のメカニズム,  
第 79 回日本衛生学会学術総会. 東京, (2009. 3)

(12) 櫻井拓也, 井澤鉄也, 木崎節子, 小笠原準悦, 白土 健, 今泉和彦, 人見嘉哲, 中野法彦, 芳賀脩光, 大野秀樹: 脂肪組織由来幹細胞の脂肪および血管内皮細胞への分化に対する運動トレーニングの影響,  
第 79 回日本衛生学会学術総会. 東京, (2009. 3)

(13) 前川剛輝, 小笠原準悦, 井澤鉄也, 櫻井拓也, 木崎節子, 長澤純一, 芳賀脩光, 大野秀樹: 急性運動は脂肪細胞の脂肪分解反応をどのように調節するのか, 第 17 回日本運動生理学会. 東京, (2009. 7)

(14) 櫻井拓也, 井澤鉄也, 木崎節子, 小笠原準悦, 前川剛輝, 芳賀脩光, 大野秀樹: 脂肪組織由来幹細胞の脂肪細胞への分化は運動トレーニングによって抑制される,  
第 17 回日本運動生理学会. 東京, (2009. 7)

(15) 小笠原準悦, 井澤鉄也, 櫻井拓也, 木崎節子, 前川剛輝, 白土 健, 今泉和彦, 芳賀脩光, 大野秀樹: 運動トレーニングによる脂肪細胞の脂肪分解反応の亢進には Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) の発現変化が関与する,  
第 64 回日本体力医学会. 新潟, (2009. 9)

(16) 井澤鉄也, 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 大野秀樹, 駒林隆夫: 脂肪細胞サイズに依存したアディポカイン遺伝子発現に及ぼす運動トレーニングの影響,  
第 64 回日本体力医学会. 新潟, (2009. 9)

(17) 櫻井拓也, 井澤鉄也, 木崎節子, 小笠原準悦, 前川剛輝, 長澤純一, 武政 徹, 芳賀脩光, 大野秀樹: 脂肪組織由来幹細胞の脂肪分化に及ぼす運動トレーニングの影響,  
第 64 回日本体力医学会. 新潟, (2009. 9)

(18) 櫻井拓也, 北舘健太郎, 西岡 浩, 藤井 創, 久島達也, 安部 茂, 木崎節子, 小笠原準悦, 白土 健, 井澤鉄也, 今泉和彦, 石田 均, 大野秀樹: ライチ由来新規低分子化ポリフェノール Oligonol は疲労改善効果をもつ,  
国際食品機能学会第 5 回研究発表会. 東京, (2008. 5)

(19) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 白土 健, 木崎節子, 井澤鉄也, 長澤純一, 今泉和彦, 大野秀樹: 急性運動と脂肪細胞のホルモン感受性リパーゼの発現変化,  
第 63 回日本体力医学会. 別府, (2008. 9)

(20) 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 大野秀樹: 脂肪細胞の  $\beta$ -アドレナリン受容体の運動による発現変化とユビキチン-プロテアソームの役割,  
第 37 回杏林医学会. 東京, (2008. 11)

(21) 櫻井拓也, 井澤鉄也, 木崎節子, 小笠原準悦, 白土 健, 石橋義永, 今泉和彦, 武政 徹, 長澤純一, 芳賀脩光, 大野秀樹: 運動トレーニングは脂肪細胞由来幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制する,  
第 6 回日本予防医学会. 鹿児島, (2008. 11)

(22) 人見嘉哲, 木崎節子, 櫻井拓也, 小笠原準悦, 武政 徹, 神林康弘, 日比野由利, 芳賀脩光, 中村裕之, 大野秀樹: 骨格筋に対する in vivo 遺伝子導入法による Calcineurin 抑制 Recan1 発現制御の検討,  
第 81 回日本生化学会. 京都, (2008. 12)

〔図書〕 (計 2 件)

(1) 小笠原準悦 (分担執筆): 運動と免疫 (ナップ, p.108-112, p. 278-283, 2009.

(2) 小笠原準悦 (分担執筆): 脂肪組織のエクササイズバイオロジー, ナップ, 印刷中, 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小笠原 準悦 (OGASAWARA JUNETSU)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 20415110

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし