

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11526

研究課題名（和文）初期メタボリックシンドロームに対する運動療法の予防・改善効果の多層的解明

研究課題名（英文）Multi-layered elucidation of the effects of exercise therapy for early metabolic syndrome

研究代表者

土持 裕胤 (Tsuchimochi, Hirotsugu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：60379948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、運動や食習慣などの環境要因によるエピジェネティックな修飾とメタボリックシンドローム発症リスクに着目し、個体、臓器、細胞、プロテオーム、エピゲノムの各レベルで、胎児期や新生児期のエピジェネティックな修飾と長期的な生活習慣による修飾を検討した。長期の高脂肪負荷マウスでは、個体の表現型、心機能、耐糖能、遺伝子やタンパク質の発現解析、オープンクロマチン領域の解析から、食事と運動の効果は相乗的であり、メタボリックシンドロームや生活習慣病の発症予防や早期治療には、食事や運動習慣の改善単独よりも、両者を組み合わせることのメリットが大きいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

誰しも食事制限や定期的な運動によるカロリー消費を行うのを好まず、それが生活習慣病の蔓延に繋がっている。生活習慣病において、環境要因に起因する疾患、症状は予防や早期治療が可能であり、これまでも食事療法や運動療法が行われてきた。その効果について、近年では遺伝子・タンパク質発現の網羅的解析やエピゲノム修飾解析が普及し、それぞれの影響を多角的に解析可能となってきた。今回、食餌療法と運動療法、およびその組み合わせの影響を調べたことで、単独よりも組み合わせの方がより大きな効果を得られることが示唆された。今後、遺伝子発現制御機構の要因も加味することで、疾患に合わせて効果的な治療法の提案が可能となる。

研究成果の概要（英文）：This study focused on epigenetic modifications due to environmental factors such as exercise and eating habits and the risk of developing metabolic syndrome, and examined epigenetic modifications during fetal and neonatal stages and modifications due to long-term lifestyle habits at the individual, organ, cellular, proteomic, and epigenomic levels. In long-term high-fat-loaded mice, the effects of diet and exercise were synergistic in several genes involved in the development of metabolic syndrome, based on individual phenotype, cardiac function, glucose tolerance, gene and protein expression analysis, and open chromatin regions. It was suggested that the combination of the two is more beneficial than improvement of diet and exercise habits alone for prevention and early treatment of the onset of metabolic syndrome and lifestyle-related diseases.

研究分野：運動生理学

キーワード：メタボリックシンドローム 運動療法 食餌療法 エピゲノム修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代社会において生活習慣病による循環器疾患の予防対策は世界的に急務である。高血圧、肥満、脂質異常症といった生活習慣病およびこれらの合併症は、個々の生体でのエネルギー摂取と利用の不一致(代謝異常)に起因するものと考えられる。したがって、この代謝異常が次の異常を引き起こす連鎖(メタボリックドミノ)を早期に阻止することが重要である。これまでに、メタボリックシンドローム由来生活習慣病の病態解明および治療を目指した研究は多数あり、モデル動物もたくさん開発されてきた。高血圧モデルとして良く用いられる Spontaneously Hypertensive Rat (SHR)、非肥満・2型糖尿病モデルの Goto-Kakizaki (GK) Rat、糖尿病を発症しない肥満モデルの Zucker Fatty Rat、糖尿病を発症する Zucker Diabetic Fatty Rat、などが広く使われている。これら中で、日本人やアジア人種の2型糖尿病患者の良いモデルとされている GK ラットを対象に、糖尿病発症初期の冠動脈血管機能および心筋クロスブリッジ動態の解析により血管内皮障害と心筋肥大・拡張障害の病態解明を目指してきた。さらに、若齢 GK ラットに持続的運動トレーニングを負荷することで2型糖尿病の発症を抑制または遅延させ得るかどうかについて研究を進めてきた。これら一連の研究において、若齢 GK ラットおよびその対照群である Wistar ラットで mRNA およびタンパク質発現の網羅的発現解析を行った結果、心機能解析結果、および遺伝子やタンパク質発現量の違いが、持続的運動トレーニングの影響よりも系統差、つまり遺伝背景に起因する影響の方がはるかに大きいことがわかってきた。メタボリックシンドローム由来生活習慣病は遺伝要因と環境要因に左右されることが明らかとなってきており、この点からも、遺伝要因と環境要因を区別して解析可能な動物モデルおよび解析手法が必要不可欠であると考えた。これまでもメタボリックシンドローム由来生活習慣病モデル動物に対する運動トレーニングの効果を調べた研究は多数報告されているが、その多くは遺伝要因と環境要因を区別していなかった。また、環境要因に絞ってメタボリックシンドロームの病態解析を行っている研究はあるが、メタボリックシンドローム発症初期を対象とした研究は少ない。メタボリックシンドロームは発症を予防することが先決であり、そのためには発症初期の病態の理解が必要であると考えた。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ本研究は、環境要因の違いに起因するメタボリックシンドローム易発症モデル動物を作出すること、それを用いて心臓・血管機能低下に対する継続的な運動の予防・改善効果を調べることを目的とした。環境要因による後天的ゲノム(エピゲノム)修飾を介した遺伝子発現制御に着目し、メタボリックシンドローム発症後の食餌療法および継続的な運動療法がエピゲノム修飾に及ぼす影響についても調べた。

3. 研究の方法

【実験1】(2020-2021年度) ~運動時によるメタボリックシンドローム改善効果~

実験には動物実験によく用いられる系統である C57BL/6J マウスを用いた。妊娠後期の食餌制限(-30~50%)による低栄養(Food Restriction: FR)、または低酸素(10-12% O₂)暴露(Maternal hypoxia: Hx)により低出生体重仔を出産させ、その後の発達を数か月観察した。どちらの群も、生後3.5週で離乳させ、生後8週齢までは標準餌(CE-2、日本クレア)を自由摂取させた。8週齢以降は高脂肪(粗脂肪約15.3%)・高カロリー(約425kcal/100g)のクイックファット(日本クレア)および10%果糖・ブドウ糖溶液を自由摂取とし、正常妊娠・標準餌・水(コントロール)群と比較した。経口グルコース負荷試験(OGTT)および麻酔下にて心臓カテーテル検査を行った。急性実験後、心臓を摘出し、RNA later で保存後、解析に用いた。

【実験2】(2021-2022年度) ~メタボリックシンドローム発症に対する食餌療法および運動療法がエピゲノム修飾に及ぼす影響~

実験には B6(J)D2F1 雄マウスを用いた。B6(J)D2F1 マウスは、雄 DBA/2 と雌 C57BL/6J を交配して生まれた仔を使用した。高カロリー餌クイックファット(日本クレア)または高脂肪餌 High Fat Diet 32(日本クレア、HFD)および高糖水を4か月間与えてメタボリックシンドローム状態(肥満、耐糖能異常、脂質異常症)にした後、安静群と運動群に分け、運動群はランニングホイール付きのケージで8週間飼養した。また、それぞれ通常餌(CE-2、日本クレア)またはクイックファット群に分けた。



Running wheel cage
(4 mo)

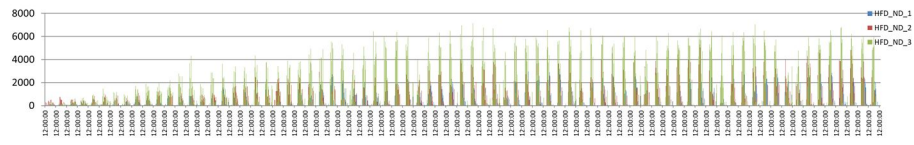


図 1：ランニングホイール付きケージと、走行距離（回転数）の経時的変化

8 週間後に OGTT および麻酔下での心臓カテーテル検査（圧および P-V loop 測定）を実施した。急性実験後、心臓を摘出し、RNA later で保存後、解析に用いた。

4．研究成果

【実験 1】

FR 群は、予定通り E19.5 で出生したが、試みた例の大半において、新生仔は生後 1 - 2 日で死亡した。死亡した個体の体重は正常出生群よりも小さかった。餌の投与量は先行研究を参考にし、さらに母親マウスの体重に合わせて微調整したが、生存率は改善しなかった。餌のカロリーや室温の違いが先行研究との違いを生じさせているのかもしれない。Hx 群は 10%O₂ だと妊娠期間が延長し、大半が死亡した。12%O₂ においても大半は出生後数日以内に死亡した。わずかに生存した個体は体重の増加がコントロール群よりも大きかった。どちらの群も、母親マウスにストレスがかかっていて十分な母乳が出ない等の可能性を考え、代理母を用いたが、生存率は上がらなかった。

【実験 2】

メタボリックシンドロームを発症させるために、マウスに幼少期から高脂肪餌を 8 週間以上与えた結果、雄性 C57BL/6J では OGTT による耐糖能異常は軽度であったが、雄性 B6(J)D2F1 マウスにおいては肥満型 2 型糖尿病自然発症モデルマウスである db/db マウスに匹敵する耐糖能異常を示した。

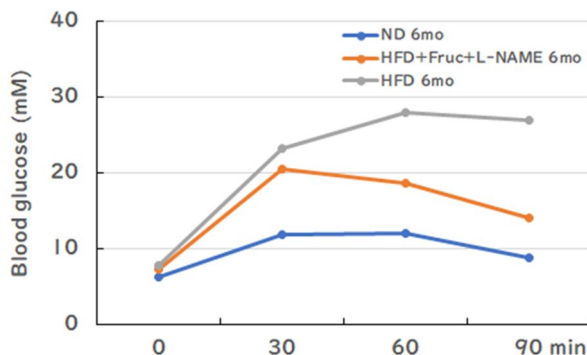


図 2：OGTT

雄 B6(J)D2F1 マウスは通常餌(ND)での血糖値は正常だが、6 か月間の高脂肪餌 HFD により重度の耐糖能異常を生じた。しかしながら、HFD に加えて果糖と L-NAME を飲水投与した群では耐糖能異常はそれほど重度ではなかった

この結果は、まず、マウスの系統（遺伝要因）によって長期の高脂肪餌（環境要因）の影響が異なることを示している。また、高脂肪餌を与える時期が早いほど、耐糖能異常が悪化する傾向があり、幼少期のエピゲノム変化が、特に雄性において耐糖能異常に大きな影響を及ぼすことを示唆するものである。

長期の高脂肪餌負荷は、生体マウスの心機能を有意に低下させることは無かったが、収縮能の軽度亢進と収縮期血圧の上昇が認められ、これらは末梢血管抵抗の増加に対する適応応答を示唆していると思われる。

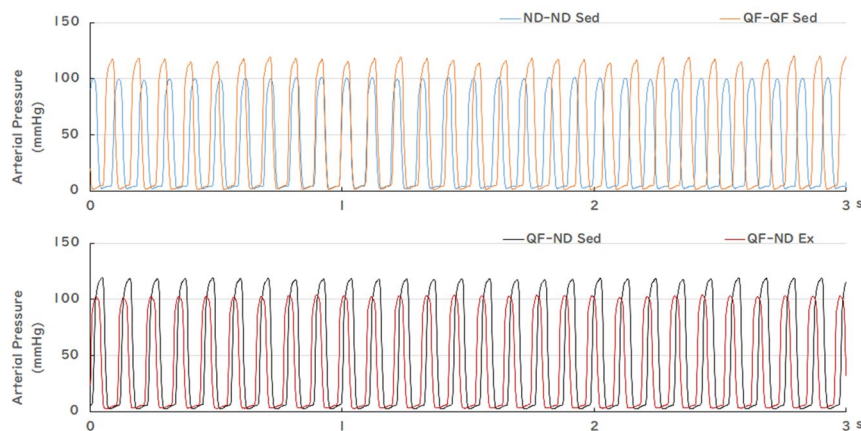


図 3：左心室圧の比較

標準餌-非運動群(ND-ND Sed)と比べ、高カロリー餌-非運動群(QF-QF Sed)は収縮末期圧が高く(>100 mmHg)、これは収縮期血圧の上昇を意味する。この上昇はQF から ND へ食餌改善した非運動群(QF-ND Sed)でも改善しなかった。一方で、食餌改善に加え自発運動を行った群(QF-ND Ex)は収縮末期圧が標準餌群と同程度(<100 Hg)であった。

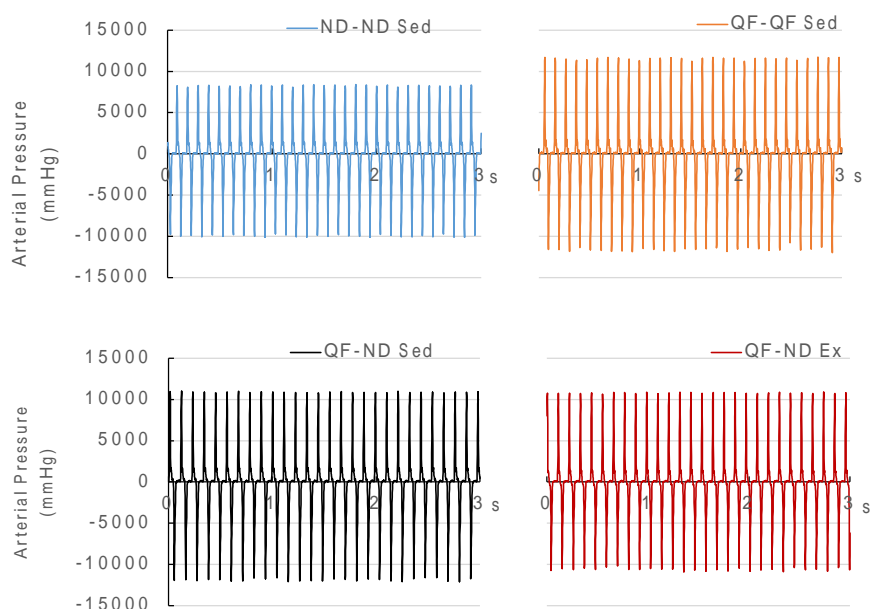


図 4：左心室圧の一次微分値(dP/dt)

ND-ND Sed に対し、他の 3 群はすべて $\pm dP/dt$ が 10000 を超えた。長期の高カロリー餌が左室の収縮・弛緩機能に慢性的な影響を及ぼし、それは短期間の食餌改善や運動習慣改善では容易に変化しないことがわかった。この dP/dt の増加をもたらした原因遺伝子・タンパク質については、現時点ではまだ特定できていない。

成体 B6(J)D2F1 マウスに長期の高脂肪餌(HFD)負荷後に、標準餌給餌+回転ケージによる自発運動を行かせた群は、ATAC-Seq によるオープンクロマチン領域解析において標準餌給餌群や自発運動群に比べて例えば脂質・糖代謝調節に関わる Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4(PDK4)等に特徴的な応答が見られた。高脂肪食は心臓におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼ・キナーゼ 4(PDK4)の発現を増加させることが示されている。PDK4 は、ピルビン酸からアセチル CoA への合成を阻害することによって代謝を制御し、それによって細胞のエネルギー源を炭水化物から脂質に変換する。

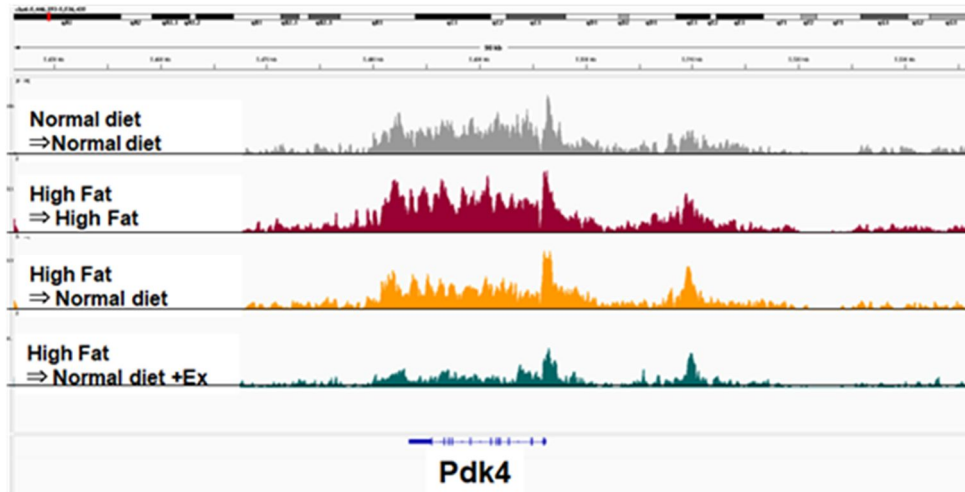


図 5 : Pdk4 遺伝子の ATAC-Seq 解析

ATAC-Seq 解析の結果、HFD によりオープンクロマチン領域が拡大し、食餌改善+運動によってそれが大幅に縮小することが示された。

今回の ATAC-Seq 解析は、高脂肪食が PDK4 のクロマチンアクセシビリティを増加させ、運動と食事介入がこれを逆転させる効果を持つことを示唆している。その他、グリコーゲン、糖、脂質の代謝の調節に関わるプロテインキナーゼ A(Pkia)や、脂質代謝に重要なアポリタンパク質についても同様に運動の影響が認められた。引き続き、これらマウスの遺伝子、タンパク質の網羅的発現解析および ATAC-Seq 解析のデータ解析を進めている。

結論

本研究課題は遺伝要因を統一し、環境要因の違いに起因するメタボリックシンドローム易発症モデル動物を作成し、遺伝子発現制御に対する食餌療法や運動療法の作用点を明らかにすることであった。メタボリックシンドロームおよび生活習慣病の発症予防および初期治療において、エピゲノム制御の点からみると、食習慣または運動習慣改善単独よりも、両者を組み合わせることの相乗効果が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土持 裕胤
2. 発表標題 Cerebrovascular function in several models of pregnancy induced hypertension in rats
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------