

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11342

研究課題名（和文）運動と9Z,11E-CLA摂取の併用は白色脂肪組織のベージュ化を誘導・促進するか

研究課題名（英文）Does the combination of exercise and 9Z,11E-CLA intake induce and accelerate differentiation of beige adipocytes in white adipose tissue?

研究代表者

櫻井 拓也（Sakurai, Takuya）

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20353477

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：白色脂肪組織（WAT）内に誘導されるベージュ細胞は、エネルギーを消費して熱産生を行うため、肥満・生活習慣病の予防・改善の鍵として注目されている。しかし、ヒトWATでは運動トレーニング（TR）単独でベージュ化は観察されていない。本研究では、共役リノール酸（CLA）のひとつである9Z,11E-CLAによって3T3-L1脂肪細胞のベージュ細胞への分化が大きく促進されるという結果が得られた。さらに、10E,12Z-CLA添加によってベージュ化に重要であると考えられる分子の遺伝子発現が増加した。以上の結果から、TRと9Z,11E-CLA摂取によってベージュ化が促進される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

白色脂肪組織（WAT）内に誘導されるベージュ細胞は、エネルギーを消費して熱産生を行うため、肥満・生活習慣病の予防・改善の鍵として注目されている。このWAT内のベージュ細胞誘導（ベージュ化）について、これまでに運動トレーニング（TR）の影響も含め多くの検討が行われている。しかし、TR単独ではヒトWATでベージュ化は起こらないとする報告がほとんどである。今回の検討から、共役リノール酸（CLA）のひとつである9Z,11E-CLAの摂取とTRの併用はベージュ化を促進させる可能性が示唆された。したがって、肥満・生活習慣病の予防・改善策の確立に9Z,11E-CLAの摂取とTRの併用が寄与できると思われる。

研究成果の概要（英文）：Beige cells induced in white adipose tissue (WAT) consume energy and produce heat, and are therefore attracting attention as a key to the prevention and improvement of obesity and lifestyle-related diseases. However, beige-isation has not been observed in human WAT during exercise training (TR) alone. In the present study, 9Z, 11E-CLA, a conjugated linoleic acid (CLA), significantly promoted the differentiation of 3T3-L1 adipocytes into beige cells. Furthermore, the addition of 10E, 12Z-CLA increased gene expression of molecules thought to be important for beige differentiation. These results suggest that TR and 9Z,11E-CLA intake may promote beige-isation.

研究分野：運動分子生物学

キーワード：肥満 2型糖尿病 運動 共役リノール酸 ベージュ化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の平成 28 年の「国民健康・栄養調査」の結果の概要によると、成人の糖尿病(2 型糖尿病)有病者の推計が、調査を開始した 1997 年以降最多となる 1,000 万人にのぼったことわかり、大きな話題となった。また、2 型糖尿病患者数を調査した厚生労働省の別の結果では、糖尿病患者数が過去最多の 328 万人超に増加したことも報告されている。

肥満は、2 型糖尿病だけでなく他の生活習慣病の発症にも密接に関わっていることがよく知られている。現在、我が国では肥満者の割合が男性では 30.7%、女性では 21.9%と、決して少なくない数が該当することから、効果的な肥満・生活習慣病の予防・改善策の確立が期待されている。実際、厚生労働省も“運動不足”を肥満の大きな原因として認識し、健康日本 21(第二次)で「運動習慣のある者の割合」の目標数値を掲げている。しかしながら、未だにその目標には到達しておらず、肥満・生活習慣病の予防・改善に対する運動効果のメカニズムも十分に解明されていない。

脂肪組織には、過剰なエネルギーを中性脂肪として蓄え、運動時など必要な際にエネルギー供給に寄与する白色脂肪組織(white adipose tissue: WAT)と、エネルギーを熱に変換して熱産生を行い、体温維持に貢献する褐色脂肪組織(brown adipose tissue: BAT)の 2 種類が存在するとされてきた。さらに、マウスに寒冷刺激を与えたり、ノルアドレナリンと同じ作用を持つ薬剤で刺激すると、皮下の WAT の中に褐色脂肪細胞に似た脂肪細胞が誘導された(ベージュ化)。この細胞は古典的な従来の褐色脂肪細胞とは別にベージュ細胞あるいはブライト細胞と呼ばれ、UCP1 が発現したミトコンドリアが豊富に存在し、褐色脂肪細胞と同等の熱産生能を持っている。さらに、ヒト成人の BAT は、その多くがベージュ細胞で構成されていることが示唆されている。一方、運動によってラットの皮下 WAT でベージュ化が観察されたことから、運動によってベージュ細胞を増やすことは肥満・生活習慣病の予防・改善に大いに役立つと考えられ、現在、運動・スポーツ科学の分野において積極的な検討が行われている。しかしながら、ヒトを対象とした検討では、TR によって皮下の WAT のミトコンドリア活性は上昇するが、ベージュ化までは観察されていない。

2. 研究の目的

上記の背景から、運動によって WAT のベージュ化を誘導・促進する方法を見つけることはできないか?、「それを解明することは新しい運動効果の発見につながるのではないか?」という着想を持つに至った。この着想をもとに、予備的検討を行ったところ、3T3-L1 脂肪細胞をベージュ細胞に分化させる際に、共役リノール酸(CLA)の異性体の 1 つである 9Z,11E-CLA を添加すると、ベージュ細胞への分化が大きく促進されるという結果が得られた。このことから、「9Z,11E-CLA の摂取を併用することによって、運動による WAT のベージュ化を誘導・促進することができるのではないか?」という学術的「問い」を持つに至った。本研究では、運動と 9Z,11E-CLA 摂取の併用によって WAT のベージュ化が誘導・促進されるかを検討することで、WAT のベージュ化をターゲットとした新たな運動の有用性を示し、肥満・生活習慣病の予防・改善効果が高い運動様式の確立に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1 9Z,11E-CLA によるベージュ細胞分化促進の分子メカニズムの解析

3T3-L1 脂肪細胞をベージュ細胞に分化させる際に、9Z,11E-CLA(Sigma Chemical, St. Louis, MO)を添加するとベージュ細胞への分化が大きく促進される分子メカニズムを検討した。具体的には、3T3-L1 脂肪細胞の各分化段階における 9Z,11E-CLA 添加の影響を細胞の形態変化を観察し、遺伝子発現の変化 DNA アレイを用いて網羅的に解析した。9Z,11E-CLA のコントロールとして 10,12-CLA(Sigma)も用いた。さらに、ミトコンドリア染色を MitoTracker(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)もしくは MitoBright LT Green(DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan)を用いて行った。

3-2 酸素消費速度(OCR)の測定

各条件で分化させたベージュ化 3T3-L1 細胞を、コラーゲン I コート(KOKEN, Tokyo, Japan)の XFe24 マイクロプレート(Seahorse Bioscience, North Billerica, MA)に 50,000 細胞/ウェルの密度で播種し、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した後、細胞を 3 回洗浄し、Seahorse XF DMEM 培地、pH 7.4(Seahorse Bioscience)に 25 mM グルコースと 1 mM ピルビン酸ナトリウムを添加した培地で 1 時間培養した。OCR は Seahorse XFe24 フラックスアナライザー(Seahorse Bioscience)を用いて測定した。OCR の測定に用いた化合物は、1 μ M イソプロテレノール(Sigma)、5 μ M オリゴマイシン(Sigma)、10 μ M FCCP、0.5 μ M アンチマイシン A(Sigma)、0.5 μ M ロテノン(Sigma)であった。

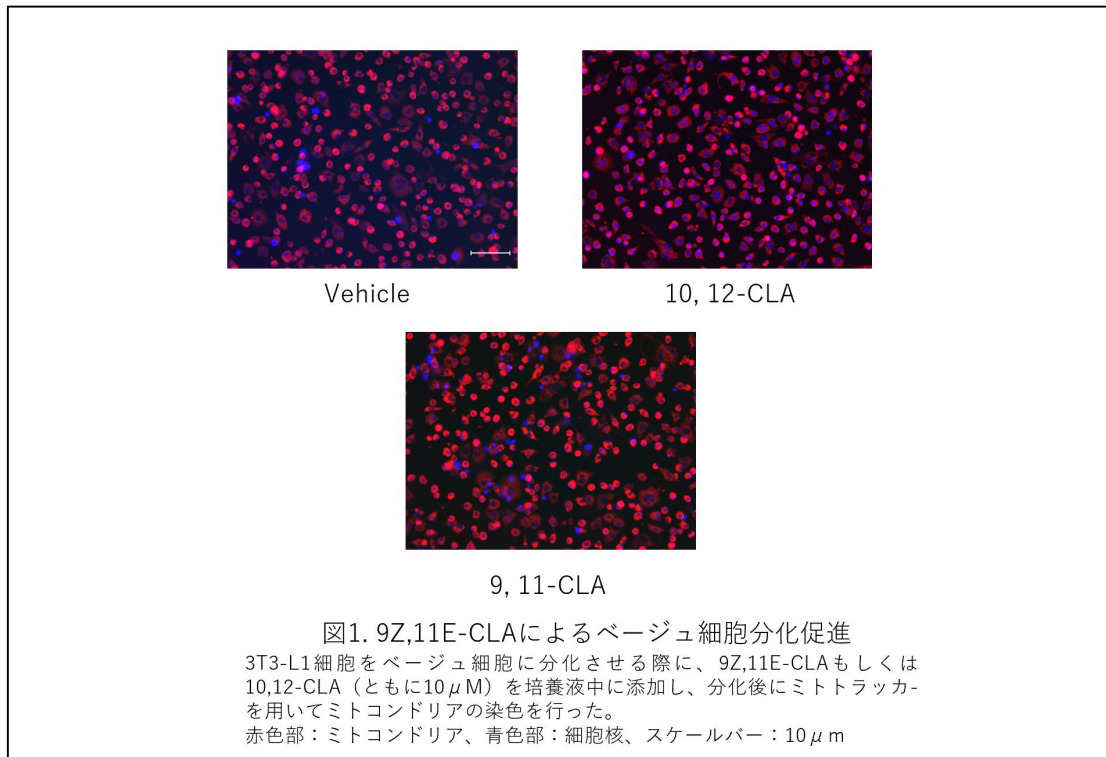
3-3 マウスの褐色脂肪組織に対する肥満・運動の影響

脂肪含量 60%の高脂肪食(HFD)を 4 ヶ月間摂取させた肥満マウス、HFD 摂取と回転ケージによる TR を施行した TR マウスならびに対照マウスの肩甲骨間 BAT における遺伝子発現の差異を DNA アレイを用いて検討した。

4 . 研究成果

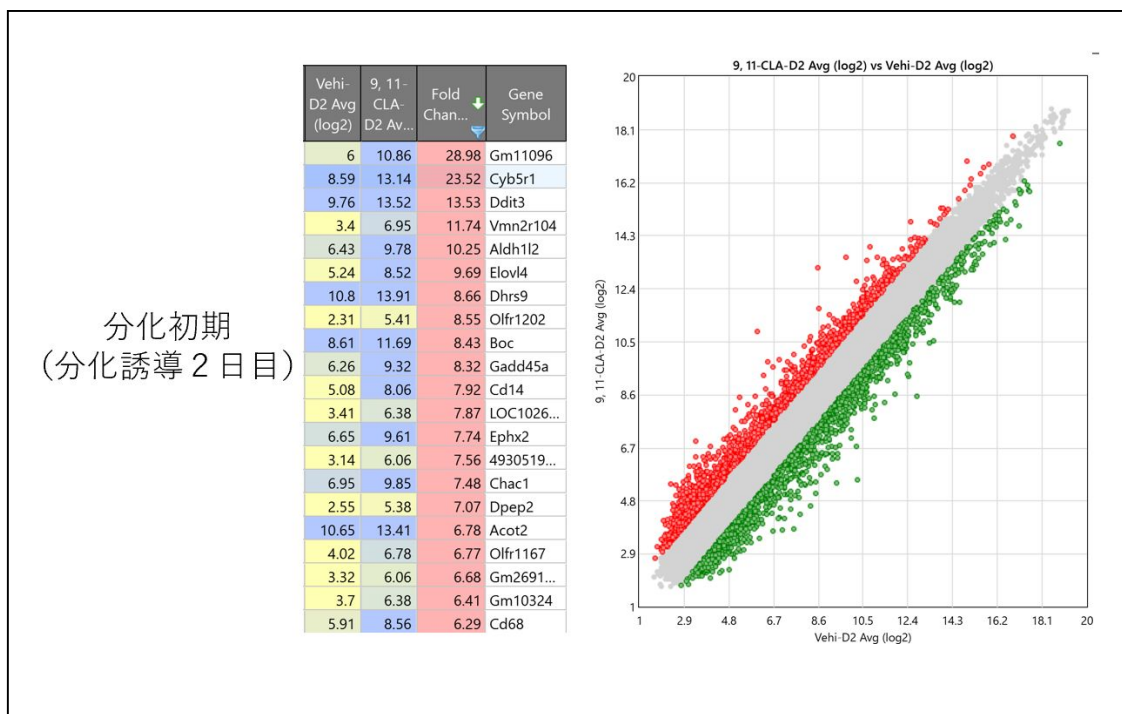
4-1 9Z,11E-CLA によるベージュ細胞分化促進

3T3-L1 細胞をベージュ細胞に分化させる際に、9Z,11E-CLA もしくは 10,12-CLA (ともに 10 μ M) を培養液中に添加し、分化後にミトトラッカーを用いてミトコンドリアの染色を行った。その結果、10,12-CLA を添加してもミトコンドリア新生はコントロール (vehicle) 細胞と差異は認められなかったが、9Z,11E-CLA を添加するとミトコンドリア新生が促進された (図 1)



4-2 9Z,11E-CLA が遺伝子発現に与える影響

9Z,11E-CLA を添加して 3T3-L1 細胞をベージュ細胞に分化させる際に、分化初期 (分化誘導 2 日目) と分化後期 (分化誘導 4 日目) に RNA を抽出し、DNA アレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。分化初期では aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2, elongation of very long chain fatty acids-like 4 や pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4 などのベージュ化に関与すると推測される遺伝子の発現が 9Z,11E-CLA によって増強された。一方、分化後期では 9Z,11E-CLA による遺伝子発現の差異は分化初期よりも少なかった。



分化後期
(分化誘導4日目)

Vehi-B2 Avg (log2)	9, 11-CLA-B2 Avg (log2)	Fold Chan...	Gene Symbol
5.05	7.45	5.29	Gm11146
2.29	4.27	3.97	Vmn2r103
2.96	4.87	3.74	Gcg
8.8	10.7	3.73	Col1a2
9.35	11.17	3.54	Gm10715
5.51	7.33	3.53	Faxc
13.12	14.88	3.38	Thbs2
10.11	11.87	3.38	Aldh12
8.92	10.67	3.36	Prrc2b
5.2	6.94	3.34	Apba1
7.12	8.83	3.27	Fbln5
3.71	5.41	3.26	Lilra6
6.94	8.64	3.25	Bcl2
4.15	5.84	3.22	Ddx3y
10.63	12.31	3.2	Adam23
8.91	10.58	3.19	Pcolce
6.8	8.47	3.16	Pitpnm1
3.88	5.54	3.16	4930512...
7.09	8.75	3.16	Pla2g4a
6.48	8.12	3.12	Setd7
8.98	10.62	3.11	Cped1

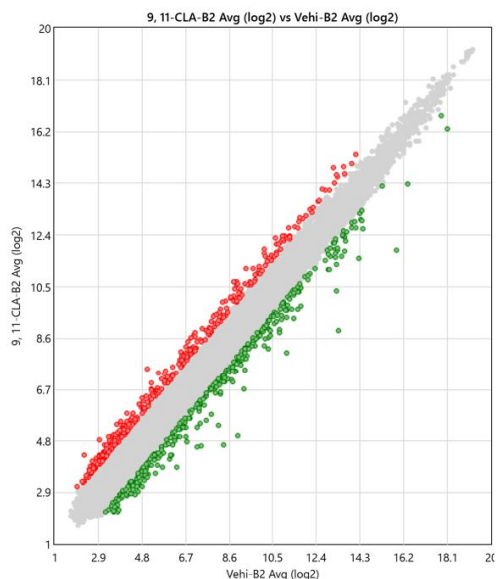


図2. 9Z,11E-CLAが遺伝子発現に与える影響

9Z,11E-CLA を添加して3T3-L1細胞をベージュ細胞に分化させる際に、分化初期（分化誘導 2 日目）と分化後期（分化誘導 4 日目）にRNAを抽出し、DNAアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

4-3 9Z,11E-CLA のミトコンドリア機能に与える影響

酸素消費速度(OCR)を測定することによってミトコンドリアの機能を調べたところ、3T3-L1 ベージュ化細胞の基礎値と FCCP 刺激時の OCR は 9Z,11E-CLA 添加によってコントロール細胞よりも増加した(図 3D)。一方、10,12-CLA の添加ではコントロール細胞と大きな差は認められなかった。

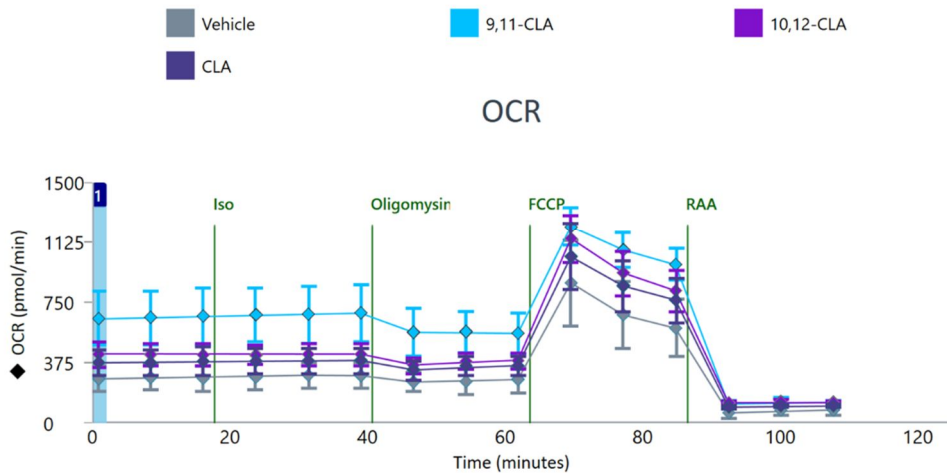


表1 マウスBATのチトクロームならびにカルシウムポンプ遺伝子の発現に対する肥満・運動の影響

Gene symbol	Gene expression level by DNA array (log2)		
	対照群	肥満群	肥満+運動群
Cyp2b10	11.24 ± 0.48	6.75 ± 0.23 ^a	5.59 ± 0.69 ^{a, b}
Cyp2e1	15.27 ± 0.29	8.55 ± 0.77 ^a	5.31 ± 0.46 ^{a, b}
Cyp2f2	7.15 ± 0.22	5.34 ± 0.29 ^a	5.20 ± 0.47 ^a
Cyp2u1	11.87 ± 0.22	12.83 ± 0.19 ^a	13.13 ± 0.32 ^a
Cyp4b1	10.45 ± 0.35	11.02 ± 0.32	10.69 ± 0.35
Atp2a1	15.15 ± 0.70	9.79 ± 1.24 ^a	13.78 ± 1.06

The mean ± SE value (n =4) is given. ^ap < 0.05 vs. control mice. ^bp < 0.05 vs. HFD mice

4-4 マウスの褐色脂肪組織に対する肥満・運動の影響

対照マウスのBATに比べて肥満マウスのBATでは、チトクローム(Cyp)2e1、Cyp2b10ならびにカルシウムポンプ遺伝子の発現が大きく減少した。一方、TRは肥満によるCyp2e1とCyp2b10遺伝子の発現低下を増強させたが、カルシウムポンプ遺伝子の発現低下を抑制した(表1)。

4-5 まとめ

マウスに寒冷刺激を与えたり、ノルアドレナリンと同じ作用を持つ薬剤で刺激すると、皮下のWATの中に褐色脂肪細胞に似た脂肪細胞が誘導される(ベージュ化)。この細胞はベージュ細胞もしくはブライト細胞と呼ばれ、古典的な従来の白色ならびに褐色脂肪細胞とは異なる第三の脂肪細胞とも呼ぶべきものとして注目を集めている。WATのベージュ化は実験動物を運動させても誘導されたことから、ヒトを対象とした運動研究も数多く行われてきた。しかしながら、ヒトを対象とした検討では、運動によって皮下のWATのミトコンドリア活性は上昇するが、ベージュ化までは観察されていない。運動によってヒト脂肪組織でベージュ化が観察されない理由についてはいくつか考えられるが、そのひとつとして「運動単独の刺激ではベージュ化の誘導は困難なのではないか」と推測した。したがって、本研究では、運動と他の条件を組み合わせることによって効率的なベージュ化を引き起こせるのではないかと考え、CLAに着目した。CLAは、必須脂肪酸であるリノール酸の位置・幾何異性体のうち、炭素鎖中に共役二重結合を有するものの総称であり、これまでに数十種の異性体が見出されている。このCLAには体重及び体脂肪減少作用など様々な効果があるとされ、サプリメントも販売されている。しかし、CLA摂取の効果はそのメカニズムも含めて未解明の点も多く残している。今回の実験結果から、CLA異性体の中でも特に9Z,11E-CLAがベージュ化促進増強機能を有することが明らかになった。さらに、9Z,11E-CLAは脂肪細胞の分化初期段階においてベージュ化に関与すると予想される因子の遺伝子発現を増強させることがわかった。また、9Z,11E-CLAによるベージュ化関連因子の遺伝子発現の増加は、ミトコンドリア機能の亢進に影響を与えていると推測された。加えて、9Z,11E-CLAによって増加したミトコンドリア新生はベージュ細胞としての機能も促進することも明らかになった。したがって、運動と9Z,11E-CLAを併用することによって、WATのベージュ化が促進される可能性が考えられた。

肥満状態になるとBATの活性が低下することが示唆されているが、そのメカニズムの解明は進んでいない。今回の検討から、肥満させたマウスのBATでは特定のチトクローム(Cyp2e1とCyp2b10)遺伝子の発現が大きく低下することがわかった。このうち、Cyp2e1は肝臓でのアルコール分解に大きく関与していることが解明されているが、その他にも脂肪酸代謝に関与していることが明らかになっている。褐色脂肪細胞の分化の際に9Z,11E-CLAを添加するとベージュ化が促進される(data not shown)ことから、Cyp2e1は褐色脂肪細胞の機能に何らかのポジティブな影響を及ぼすことが予想された。しかし、運動させるとCyp2e1の遺伝子発現が肥満単独群よりもさらに低下することから、更なる検討が必要である。

本検討の結果から、9Z,11E-CLAによるベージュ化促進のメカニズムが解明できた。今後は運動との併用など更なる検討を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakurai T, Fukutomi T, Yamamoto S, Nozaki E, Kizaki T	4. 巻 22
2. 論文標題 Physical activity attenuates the obesity-induced dysregulated expression of brown adipokines in murine interscapular brown adipose tissue.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 10391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻井拓也, 山本幸子, 野崎江里子, 木崎節子
2. 発表標題 マウス褐色脂肪組織におけるチトクローム遺伝子発現に対する肥満の影響
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井拓也, 山本幸子, 野崎江里子, 木崎節子
2. 発表標題 マウス褐色脂肪組織におけるチトクローム遺伝子発現に及ぼす肥満の影響
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 櫻井拓也, 福富俊之, 山本幸子, 野崎江里子, 木崎節子
2. 発表標題 運動は肥満によるマウス褐色脂肪組織におけるブラウンアディポカインの発現異常を減弱する
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井拓也, 福富俊之, 山本幸子, 野崎江里子, 木崎節子:
2. 発表標題 運動は肥満によるブラウンアデイポカインの発現異常を減弱する
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
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
研究分担者	福富 俊之 (Fukutomi Toshiyuki) (30439187)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	
研究分担者	山本 幸子 (Yamamoto Sachiko) (70434719)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	
研究分担者	加藤 久詞 (Kato Hisashi) (30780275)	独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・内分泌代謝高血圧研究部・研究員 (84305)	

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
---------	---------