

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650449

研究課題名(和文) 若齢期における食育および体育のレガシー効果と肥満および運動記憶因子の探索

研究課題名(英文) Research for the Legacy Effect of Dietary and Physical Educations and the Factor of Memories of Obesity and Exercise in Childhood

研究代表者

木村 真規 (Kimura, Masaki)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：40383666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では若齢期の食および運動習慣が成熟期の骨格筋・肝臓・脂肪組織の遺伝子発現に及ぼすレガシー(遺産, 長期的)効果について, マウスを用いた検討を行った。

本研究の結果から, 若齢期の高脂肪食摂取や自発走運動の経験は, たとえ成熟期に同様の食・生活環境および体重であっても, 骨格筋・肝臓・脂肪組織の遺伝子発現にレガシー効果を生じる可能性が示唆された。また一部の遺伝子発現においては, 自発走運動経験によるレガシー効果にプロモーター領域のDNAメチル化によるエピジェネティックな機序が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the legacy effect of food intake and exercise in childhood on the gene expression profiles of skeletal muscle, liver, and fat tissue in adulthood by using mice.

Our results suggested that the high fat diet and exercise in childhood might produce the legacy effect on the gene expression profiles of skeletal muscle, liver, and fat tissue in Adulthood even though the mice have almost same body weight and life style. And some of the gene expressions in adulthood also have the epigenetics changes produced by DNA methylation on the promoter regions after exercise in childhood.

研究分野：生理学, 運動生理学, 病態生理学

キーワード：レガシー効果 運動 高脂肪食 網羅的遺伝子発現 脂肪 骨格筋 肝臓 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、実験的環境下では厳格な食事療法、運動療法、薬物療法の実施によって、肥満症やメタリックシンドロームは改善可能であることを報告してきた(Kimura ら 2006, Shinozaki ら 2008)。しかし、実際の臨床現場では肥満治療後に長期に亘って適正体重を達成・維持できる者は少なく、多くの者が治療抵抗性を示している。

最近、我々は高脂肪食摂取による若齢期の肥満は、その後の食生活の改善によっても完全には是正されず、体脂肪量、血糖値、血清脂質などが高値となることを見出している。この現象は、あたかも肥満状態が新しいエネルギーバランスのセットポイントとして記憶されているかのようであり、過去の肥満経験が何らかの因子(肥満記憶因子)を活性/抑制することによって、食生活改善後においても脂肪の蓄積を積極的に維持し、糖・脂質代謝異常を誘起している可能性が示唆される(肥満経験の負のレガシー効果)。

また我々は、過食性肥満モデルラットに対する若齢期の運動習慣がその後の成熟期・老齢期においても低体重を維持する現象を報告した(Suzuki ら 2011)。この場合においては摂餌量や活動量(基礎代謝量)に変化は認められないにも拘らず、糖・脂質代謝は良好な状態を維持していたことから、過去の運動経験によっても何らかの因子(運動記憶因子)が変化することによって、成熟期・老齢期において脂肪の蓄積を抑制し、糖・脂質代謝を良好に維持する可能性が示唆された(運動経験のレガシー効果)(Kimura ら 2013)。

### 2. 研究の目的

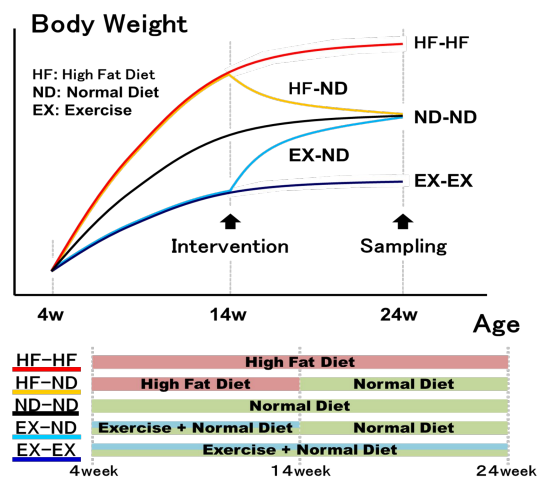
そこで本研究では、若齢期の食・運動習慣がその後の成熟期・老齢期に及ぼすレガシー効果とその機序について、骨格筋、肝臓、脂肪組織中に発現する遺伝子の網羅的およびエピジェネティクスの解析による肥満・運動記憶因子の探索から明らかにすることを試みた。本研究は、若齢期肥満・運動のレガシー効果を明らかにする点に特色・新規性があり、その結果、若齢期における食育(食習慣)・体育(運動習慣)の重要性が示され、同時に肥満・運動記憶因子と食事療法・運動療法の実施時期との関係が明らかになることで、ライフステージ全体を通じた食育および体育の重要性を提案可能となることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象および飼育方法

3 週齢の雄性 ICR マウス(20 匹)を対象に、普通食(CE-2, 日本クレア)にて集合ケージ(15×12×21cm/4 匹)を用いた 1 週間の予備飼育を行った。4 週齢時に個別ケージ(8×8×21cm)に移動させ、平均体重が一致するように以下の 5 つに群分けをした。1) 普通食(ND-ND)群: 4 週齢より普通食(CE-2, 日本ク

レア)を与えて 24 週齢時にサンプリングを行った。2) 高脂肪食(QF-QF)群: 4 週齢より高脂肪食(Quick Fat, 日本クレア)を与えて 24 週齢時にサンプリングを行った。3) 高脂肪食 普通食(QF-ND)群: 4 週齢より高脂肪食を与えて 14 週齢まで飼育した。14 週齢時に高脂肪食を普通食へ変更し、24 週齢まで飼育してサンプリングを行った。4) 運動(EX-EX)群: 4 週齢より回転ホイール(周囲長 67cm, 幅 5cm)付の個別ケージ(8×8×21cm)を用いて 24 週齢まで自発運動が可能な環境で飼育した。餌は普通食とした。5) 運動 普通食(EX-ND)群: 4 週齢より回転ホイール付個別ケージを用いて 14 週齢まで飼育した。14 週齢時に回転ホイールにアクセスできないように敷居扉を閉鎖して運動を中止し、24 週齢まで飼育してサンプリングを行った。餌は普通食とした。



#### (2) サンプリング方法

各種のモデル動物作成後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下(50mg/kg, i.p.)にて腹部下大静脈にカニューレを挿入し、全血採血を行った。得られた血液は遠心分離後、上清を-80℃で保存した。心臓、肝臓、下肢骨格筋(前脛骨筋, EDL, 腓腹筋, ヒラメ筋, 足底筋)を摘出して秤量し、肝臓と前脛骨筋はドライアイスにて急速凍結後に-80℃で保存した。また各種脂肪組織(副睾丸周囲脂肪, 後腹膜脂肪)は、摘出・秤量後、ドライアイスにて急速凍結し、-80℃で保存した。

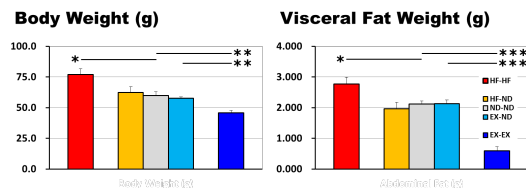
#### (3) 解析方法

前脛骨筋、肝臓、副睾丸周囲脂肪からRNeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN 社)を用いて Total RNA を抽出し、cDNA 化して Agilent Technologies 社の SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray を用いて網羅的遺伝子発現データを解析して候補遺伝子の選出を行った。DNA マイクロアレイ解析を行った検体は QF-QF 群, ND-ND 群, EX-EX 群においては体重が群内平均に最も近い個体を、QF-ND 群および EX-ND 群においては ND-ND 群から選抜された個体の体重に最も近い個体を対象とした(全部で n=5 を選抜)。

その後、DNA マイクロアレイ解析によって選出された肥満・運動記憶因子の候補遺伝子を Realtime-PCR 法にて定量評価した。また一部の候補遺伝子については、各組織から DNA を抽出後プロモーター領域の DNA メチル化率をパイロシーケンス法によって評価した。

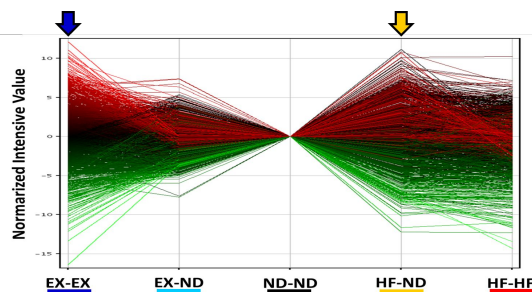
#### 4. 研究成果

サンプリングを行った 24 週齢時の体重は QF-QF 群:76.3±9.7g QF-ND 群:61.5±9.9g, ND-ND 群:59.6±6.3g EX-ND 群:57.5±2.6g, EX-EX 群:46.1±4.1g であった。



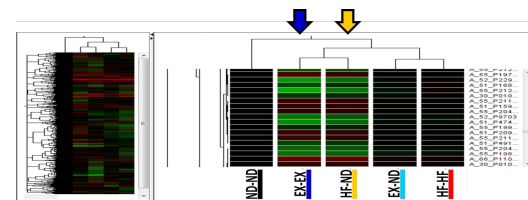
まず脂肪組織に於いて約 3 万個の遺伝子を対象に解析を行った結果、ND-ND 群と比較して QF-ND 群では 2 倍以上の増加を示した遺伝子は 1,330 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 1,689 個、EX-ND 群ではそれぞれ 633 個と 730 個であり、QF-ND 群および EX-ND 群は ND-ND 群と同様の体重、食・生活環境であるにも拘わらず、両者とも ND-ND 群とは発現の大きく異なる遺伝子を有しており、14 週齢までの生活環境が 24 週齢時の脂肪組織における遺伝子発現に影響を及ぼし、レガシー効果を示す可能性が示唆された。また変化を示した遺伝子の数は EX-ND 群よりも QF-ND 群が多かったことから、自発運動よりも高脂肪食摂取の方がレガシー効果は強い可能性が示唆された。

次に、大きく変動した遺伝子を QF-QF 群と QF-ND 群で比較したところ、両者に共通して 2 倍以上の増加を示した遺伝子は 413 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 566 個であり EX-EX 群と EX-ND 群の比較では、それぞれ 148 個と 407 個であった。次に ProfilePlot 解析によって各群の遺伝子変化の特徴を比較したところ、EX-EX 群の遺伝子変化と類似性が示唆されたのは EX-ND 群ではなく、むしろ QF-ND 群であった。



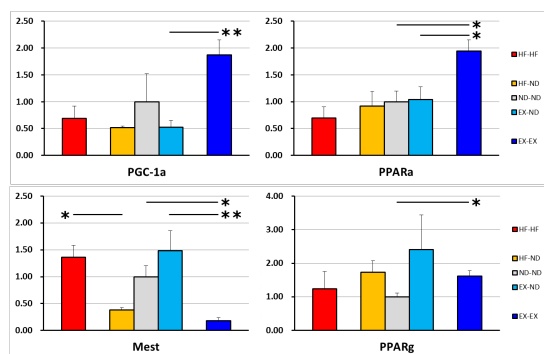
そこで各群の相同性について検討するために Hierarchical Clustering 解析を行ったところ、相同性は EX-EX 群と QF-ND 群の組み合わせ、QF-QF 群と EX-ND 群の組み合わせで高いことが示された。確認の為、大きく変

動した遺伝子を EX-EX 群と QF-ND 群で比較したところ、両者に共通して 2 倍以上の増加を示した遺伝子は 441 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 699 個であり、QF-QF 群と EX-ND 群の比較ではそれぞれ 364 個と 435 個であったことから、14 週齢までの生活環境が同一の QF-QF 群と QF-ND 群の組み合わせ、EX-EX 群と EX-ND 群の組み合わせよりも多くの遺伝子変化を見出すことができた。



同様に骨格筋と肝臓において網羅的遺伝子発現の解析を行った結果、骨格筋では ND-ND と比較して HF-HF で 2 倍以上増加した遺伝子は 401 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 337 個であり HF-ND にもそれぞれ 322 個、421 個観察された。また ND-ND と比較して EX-EX で 2 倍以上増加した遺伝子は 415 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 377 個であり、EX-ND にもそれぞれ 347 個、356 個観察された。次に肝臓では ND-ND と比較して HF-HF で 2 倍以上増加した遺伝子は 571 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 628 個であり、HF-ND にもそれぞれ 451 個、559 個観察された。また ND-ND と比較して EX-EX で 2 倍以上増加した遺伝子は 509 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 772 個であり EX-ND にもそれぞれ 483 個、553 個観察された。

#### Realtime-PCR of Representative Gene

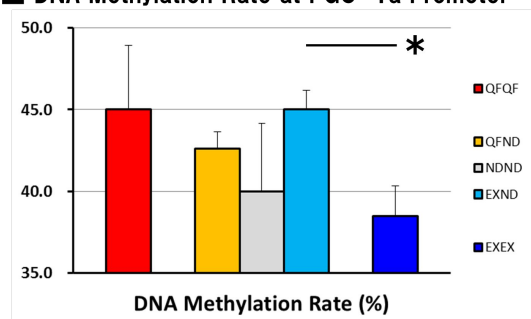


以上の結果から HF-ND および EX-ND は ND-ND と同様の体重、食・生活環境にも拘わらず ND-ND と発現の大きく異なる遺伝子が観察されたことから、脂肪組織と同様に若齢期の食および運動習慣がその後の骨格筋および肝臓の遺伝子発現にレガシー効果を生じる可能性が示唆された。

またレガシー効果の可能性が示唆された遺伝子について Realtime-PCR を実施したところ、脂肪組織では PPARg, PGC-1a, Mest などの遺伝子に特徴的な変化が観察され、特に PGC-1a の遺伝子においては Pyrosequence 法による DNA プロモーター領域のメチル化解析によって自発走運動によるレガシー効果に

エピジェネティック的機序が関与した可能性が示唆された。

#### ■ DNA Methylation Rate at PGC-1 $\alpha$ Promoter



#### <引用文献>

Masaki Kimura, Tomokazu Shinozaki, Naoto Tateishi, Emi Yoda, Hideki Yamauchi, Masato Suzuki, Makoto Hosoyamada, Toshiaki Shibasaki (2006) Adiponectin is regulated differently by chronic exercise than by weight-matched food restriction in hyperphagic and obese OLETF rats. *Life Sciences*, 79: 2105-2111.

Tomokazu Shinozaki, Masaki Kimura, Makoto Hosoyamada, Toshiaki Shibasaki. (2008) Fluvoxamine inhibits weight gain and food intake in food restricted hyperphagic Wistar rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(2): 2250-2254.

Masato Suzuki, Daisuke Shindo, Masaki Kimura, Hidefumi Waki. (2011) Effects of exercise, diet, and their combination on metabolic- syndrome-related parameters in OLETF rats. *International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism*, 21(3):222-232.

Masaki Kimura. (2013) Genes and molecules related to obesity and lifestyle-related disease and exercise. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 2:111-115.

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 1 件)

Masaki Kimura (2013) Genes and molecules related to obesity and lifestyle-related disease and exercise. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 2:111-115. 査読有

##### [学会発表](計 4 件)

木村真規, 齋藤義正, Jonathan P. Whitehead, 齋藤英胤 (2014) 若齢期に

おける高脂肪食摂取が成熟期の脂肪組織中遺伝子発現に及ぼす長期的効果. 肥満研究, 20(Supplement): Pp.220 / 第 35 回 日本肥満学会大会, 2014.10.24-25 (宮崎)

木村真規, 齋藤義正, Jonathan P. Whitehead, 鈴木政登, 齋藤英胤 (2014) 運若齢期における運動が成熟期の脂肪組織中の遺伝子発現に及ぼすレガシー的効果. *体力科学*, 63(6): Pp.604 / 第 69 回 日本体力医学会大会, 予稿集: Pp.197 / 2014.09.19-21 (長崎)

木村真規, Jonathan P. Whitehead, 齋藤義正, 齋藤英胤 (2014) 若齢期マウスにおける高脂肪食摂取および運動が成熟期の脂肪組織中遺伝子発現に及ぼすレガシー効果. 第 14 回 日本抗加齢医学会総会, プログラム・抄録集: Pp.44 / 2014.06.07-08 (大阪)

Masaki Kimura, Jonathan P. Whitehead, Yoshimasa Saito, Hidetsugu Saito (2014) The legacy effects of high fat diet and running exercise in childhood on gene expression profiles of adipose tissue in adult mice. 19th Annual Congress of the European College of Sport Science, eBook of Abstracts / 2014.07.02-05 (Amsterdam, Netherlands)

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

木村 真規 (KIMURA, Masaki)  
慶應義塾大学・薬学部・講師  
研究者番号: 40383666