

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350915

研究課題名(和文) 環境温度や実施時期に着目した運動効果と白色脂肪を褐色脂肪化する新規物質との関連性

研究課題名(英文) Contribution of novel hormone "Irisin", which is shown to induce adipocyte browning, to the environment and the timing of implementation of exercise

研究代表者

太田 雅規 (Ohta, Masaonri)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：70341526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：白色脂肪を褐色脂肪化する新規物質「イリシン」に着目し、環境温度、特に寒冷曝露や運動開始時期による運動効果の違いについて検討を行うことを目的とし、(1)慢性的な寒冷曝露下での身体活動の有無によるイリシン発現の違い、(2)有酸素運動の介入時期による効果の違いとイリシン発現との関係、について検証した。

その結果、寒冷環境下での作業者は常温環境下での作業者に比べイリシンレベルが高いことが示された。また、暑くなる時期の12週間の運動介入でのイリシンレベルは増加を示さないが、寒くなる時期の運動介入では有意な増加を示した。ただし、測定キットに交差反応を疑う報告もあり、結果の解釈には注意が必要である。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to elucidate the effect of working environment and exercise on the expression of "irisin," a novel hormone shown to induce adipocyte browning. For this purpose, we investigated (1) the expression of irisin in workers exposed to a cold environment and (2) the comparison with the changes in the expression of irisin between participants who exercised from spring to summer and in participants who exercised from autumn to winter.

Our results showed higher expression of irisin in participants working in a cold environment than in a normal environment. Moreover, the expression of irisin appeared to increase in participants who exercised from autumn to winter, whereas there was no significant change in the expression of irisin in participants who exercised from spring to summer. Further study would be required in order to verify the present results due to the suspicion of cross reactivity of ELISA kit.

研究分野：健康科学

キーワード：イリシン 寒冷環境 運動 季節性

1. 研究開始当初の背景

わが国を始め、世界中で生活習慣病は増加の一途をたどっている。予防対策として運動の実践が推奨されており、我々も生活習慣病の是正効果や生活習慣病の発症や進展に関与している酸化ストレスの軽減効果を報告している¹⁻⁵⁾。

しかしながら、運動介入の効果としては、実施時期により体脂肪率の減少効果等、介入効果に違いがあることを経験することが多い。実際、我々が1999年から行っている健康増進事業の介入データによると、春に行った健康増進事業の方が冬に行った同様の事業よりも体脂肪率の減少量が大きく、酸化ストレス指標(TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances)については冬に行った方が軽減効果は大きかった(図1,太田ら,未発表資料)。

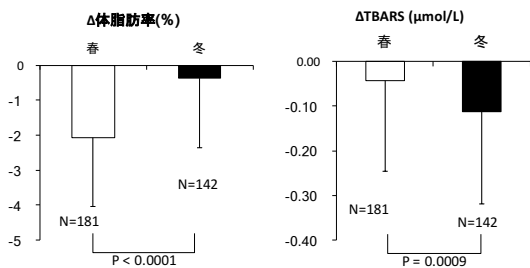


図1. 実施時期による生活習慣修正指導の効果の違い(太田ら,未発表資料)

2012年1月に運動によって筋肉から分泌される新規物質「イリシン(Irisin)」が、白色脂肪を褐色脂肪様に遺伝子発現に作用することで(褐色脂肪化)、エネルギー消費を増やすとの興味深い発表がなされた⁶⁾。この新規物質は、寒冷適応にも関与があると示唆されている。本報告によると、ヒトにおいても10週間の有酸素レベルの運動により血漿中のイリシンレベルが約2倍増加するとしており、動物実験においてmRNAレベルはwheel runningよりも水中運動(32°C)の方が増加量は多いという結果が示されている。また、肥満ホルモンであるレプチンは、白色脂肪から分泌され、中枢に作用し摂食抑制に作用し、活動量を増やし肥満を抑制する方向に作用するが、イリシンの作用でレプチンの発現は低下したと報告しており、脂肪減少に対しては抑制的に働く可能性も示唆される。さらに、白色脂肪には通常認められない脱共役蛋白質-1(uncoupling protein-1, UCP-1)がイリシンの作用により増加することで褐色脂肪化に働くが、UCP-1はミトコンドリアでの酸化ストレスを軽減することが示されてきている⁷⁾。

一般に、基礎代謝は夏に低下し、冬に増加する。寒冷適応と運動には交叉適応(cross adaptation)が存在し、運動トレーニングによる体力の増大は耐寒性を高めるが、一方で、寒冷適応により運動耐性が低下するといわれている⁸⁾。従って、環境温度の違いが運動介入の開始時期による効果の違いに影響を及ぼし

ている可能性が示唆される。しかし、環境温度の違いと運動効果について、イリシンの関与に着目して検証した報告は皆無である。

2. 研究の目的

運動により発現が増加し、白色脂肪を褐色脂肪化する新規物質「イリシン」に着目し、環境温度、特に寒冷曝露や運動開始時期による運動効果の違いのメカニズムについて検討を行うことを目的とした。

(1)慢性的な寒冷曝露下での身体活動の有無によるイリシン発現の違い

(2)有酸素運動の介入時期による効果の違いとイリシン発現との関係

3. 研究の方法

(1)慢性的な寒冷曝露下での身体活動の有無によるイリシン発現の違い

<対象>

職業的に寒冷環境下で作業している作業者(ライン作業と荷物の運搬等動作を伴う作業)と常温帯で同様の作業をしている作業者、対照として空調された室内で事務作業をしている作業者を対象とした。内訳は以下に示すとおりである。

対象者(6カ月以上勤務している労働者)*

- ① 寒冷環境(0-5°C)での作業者(寒冷作業者、N=15)
- ② 常温環境(室温)での作業者(常温作業者、N=14)
- ③ 事務作業(室温)(事務作業者、N=8)

*定期的な運動習慣無し、内服無しの者を対象とした(38名中1名除外)。

<測定内容>

測定内容は以下の項目について行った。

- ① イリシン(ELISA法)
- ② 生活習慣病関連因子(肥満度、インピーダンス法による体組成、血圧、糖・脂質代謝)
- ③ 酸化ストレス指標(尿中8-isoprostane(ELISA法), derivatives of reactive oxygen metabolites(dROM, 比色法), biological antioxidant potential(BAP, 比色法), 血漿 Superoxide dismutase(SOD)活性(SOD assay kit)
- ④ 安静時代謝(メタボリックアナライザー, MedGem)

(2)有酸素運動の介入時期による効果の違いとイリシン発現との関係

9月から12月にかけての寒くなる時期および6月から9月にかけての暑くなる時期の2度にわたり、10週間の有酸素運動による運動介入研究として、無作為比較試験を行った(図

2)。

対象者の募集は上記の2度にわたって行い、寒くなる時期は21名(男性13名、女性8名)、暑くなる時期は28名(男性16名、女性12名)の参加を得た(大学教職員)。それぞれ無作為に運動群と対照群に分け、10週間の研究期間の前後に検査を行った。

採血は空腹時に行い、血清脂質及び糖代謝に関する項目とイリシンを測定した。イリシンはELISA法(AdipoGen International)にて測定した。推定最大酸素摂取量の測定は、最大下多段階運動負荷試験を自転車エルゴメーターを用いて行った。有酸素運動として最大酸素摂取量の50%強度で、1回30分、週3回実施した。形態計測、血圧測定に加え、安静代謝の測定としてMetabolic Analyzer MedGem™を用いた。

解析は、2群比較にはWilcoxon/Kruskal-Wallisの検定(順位和)、介入効果についてはWilcoxonの符号付順位検定、2変数の相関にはSpearmanの順位相関係数を用いた。すべての解析はJMP Pro 10.0.2~12.2.0(SAS Institute Inc.)を用いた。解析には内服しているものは除外して行った(寒くなる時期:N=4、暑くなる時期N=3)。介入による変化量は平均±SEで示した。

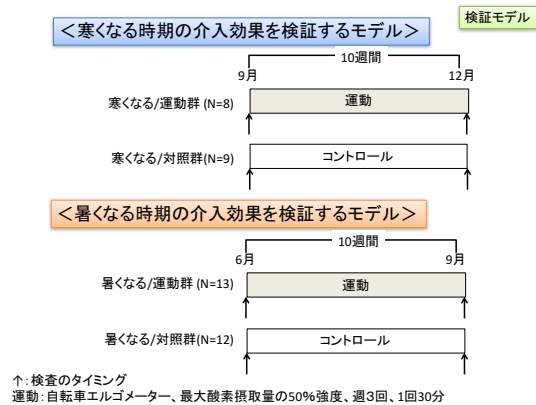


図2. 検証モデル

4. 研究成果

(1) 慢性的な寒冷曝露下での身体活動の有無によるイリシン発現の違い

① 対象者の特性

表1に対象者の主な特性を示す。表に示すとおり、寒冷作業員、常温作業員、事務作業員の間には性、年齢、形態的指標、安静代謝に有意な差を認めなかった。

変数	事務作業員(N=8)	常温作業員(N=14)	寒冷作業員(N=15)	P
Age (yo)	40.1 ± 10.4	40.4 ± 11.5	46.8 ± 10.1	0.21
Height (cm)	163.7 ± 9.0	164.8 ± 9.9	162.6 ± 6.1	0.79
Weight (kg)	60.6 ± 13.1	62.3 ± 15.6	61.2 ± 10.9	0.95
% Fat (%)	28.1 ± 8.8	25.5 ± 7.6	27.1 ± 8.1	0.74
Fat mass (kg)	17.5 ± 7.9	16.1 ± 7.2	16.9 ± 6.6	0.90
Fat Free Mass (kg)	43.0 ± 8.6	46.1 ± 11.1	44.2 ± 7.6	0.73
BMI	22.4 ± 3.8	22.7 ± 3.4	23.1 ± 3.5	0.90
Waist (cm)	79.1 ± 8.7	82.4 ± 13.7	78.9 ± 9.8	0.67
RMR	1260.0 ± 198.0	1397.9 ± 316.3	1300.7 ± 173.8	0.38
SBP (mmHg)	126.0 ± 20.4	120.0 ± 14.9	118.8 ± 12.8	0.56
DBP (mmHg)	82.0 ± 17.1	74.2 ± 7.7	74.3 ± 9.4	0.23
PR (/min)	78.5 ± 6.5	72.1 ± 11.2	72.6 ± 6.6	0.21
RMR/FFM	29.7 ± 3.9	30.6 ± 4.7	29.6 ± 2.8	0.77
Sex (Female %)	M5 / F3, 62.5%	M8 / F6, 57.1%	M8 / F7, 53.3%	0.91
Smoker (Current/Ex/Non)	1/1/6	4/0/10	4/0/10	0.70

No exercise habit, and no medication. The workers who have worked there more than 6 months.

表1. 対象者の特性

② 環境温度とイリシンの関係

イリシンは、寒冷作業員において、常温作業員や事務作業員よりも有意に高かった(図3)。

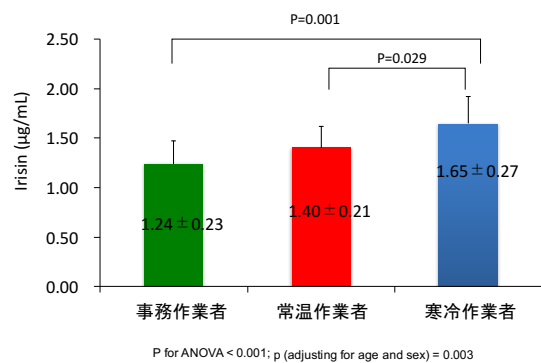


図3. 環境温度とイリシンの関係

③ 除脂肪量当たりの安静代謝量とイリシンとの関係

一般に、エネルギー消費の約80%は除脂肪量(Fat-free mass: FFM)で説明がつくとされていることから⁹⁾、今回得られたデータについて、イリシンと除脂肪量当たりの安静代謝量との関係を、環境温度の違いで検証を行った。

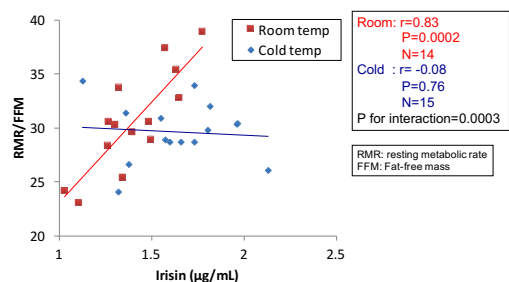


図4. 除脂肪量当たりの安静代謝量とイリシンとの関係

その結果、図4に示すとおり、常温作業員では、除脂肪量当たりの安静代謝量とイリシンとの間に有意な正の相関を認めたが、寒冷作業員では有意な相関を認めなかった。

④ 考察

イリシンによって発現される PPAR α は、寒冷環境の適応の主要な要因と報告されている¹⁰⁾。今回、寒冷環境で6ヶ月以上作業をしている労働者において、常温環境での労働者よりもイリシンが高いことが示された。イリシンは、寒冷環境で作業する労働者の寒冷適応のひとつの指標となるかもしれないと考えられた。

(2)有酸素運動の介入時期による効果の違いとイリシン発現との関係

① 対象者の特性

寒くなる時期に始めた群、暑くなる時期に始めた群の2群間に、年齢、形態計測、血圧、最大酸素摂取量、安静代謝、血清脂質および糖代謝、イリシンレベルに有意な差を認めなかった(表2, 3)。

表2. 対象者の特性(1)

variables	寒くなる(N=17)		暑くなる(N=25)		P value
	mean	SD	mean	SD	
年齢(歳)	33.5±8.0		34.3±11.0		0.69
性別(人数:男性/女性)	9/8		13/12		0.95
体重(kg)	61.6±11.9		62.3±11.2		0.92
体脂肪率(%)	24.9±7.7		24.2±8.8		0.80
除脂肪量(kg)	46.0±9.0		46.8±7.9		0.71
BMI (kg/m ²)	22.4±3.7		22.5±3.6		0.92
腹囲 (cm)	79.2±9.1		77.5±10.9		0.52
SBP (mmHg)	121.0±17.1		117.6±9.8		0.32
DBP (mmHg)	75.3±12.8		74.8±7.8		0.81
PR (回/分)	71.4±8.6		69.6±8.7		0.52
最大酸素摂取量 (ml/kg/min)	37.2±6.4		40.3±8.3		0.27
安静代謝(kcal)	1347.1±222.7		1414.8±224.2		0.49

寒くなる時期:9月→12月にかけてRCTIによる運動介入研究実施
暑くなる時期:6月→9月にかけてRCTIによる運動介入研究実施
Wilcoxon/Kruskal-Wallisの検定(順位和), χ^2 乗検定

表3. 対象者の特性(2)

variables	寒くなる(N=17)		暑くなる(N=25)		P value
	mean	SD	mean	SD	
総コレステロール (mg/dl)	187.1±37.5		188.6±37.3		0.94
中性脂肪 (mg/dl)	91.3±67.4		82.3±35.6		0.84
HDL-コレステロール (mg/dl)	66.3±13.9		60.4±9.9		0.13
LDL-コレステロール (mg/dl)	105.2±30.0		114.6±34.7		0.35
nonHDL (mg/dl)	120.8±37.3		128.1±34.2		0.42
空腹時血糖(mg/dl)	99.4±14.5		95.1±7.2		0.56
空腹時インスリン (μ U/ml)	5.6±3.9		5.8±2.9		0.58
HOMA-IR	1.5±1.4		1.4±0.7		0.63
イリシン (μ g/mL)	7.1±1.1		6.7±1.2		0.21

寒くなる時期:9月→12月にかけてRCTIによる運動介入研究実施
暑くなる時期:6月→9月にかけてRCTIによる運動介入研究実施
Wilcoxon/Kruskal-Wallisの検定(順位和)

② 介入効果

寒くなる時期の群も暑くなる時期の群も、運動群は有意に最大酸素摂取量が増加した(寒くなる時期の運動群: $+2.9 \pm 1.5$ ml/kg/min, $p=0.02$, 暑くなる時期の運動群: $+2.0 \pm 0.5$ ml/kg/min, $p=0.03$ 、図5)。

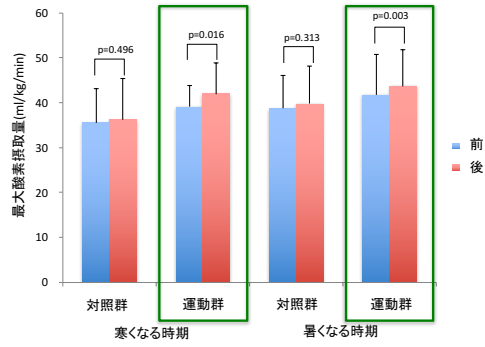


図5. 最大酸素摂取量に対する効果と介入時期

③ 安静代謝およびイリシンに対する効果

安静代謝は、寒くなる時期は運動群も対照群もいずれも有意に増加し、暑くなる時期は対照群において有意に低下したが、運動群は有意な変化を認めなかった(図6)。

イリシンは寒くなる時期の運動群においてのみ有意に増加した(前: 7.1μ g/ml, 後: 7.9μ g/ml, 増加量: 0.78 ± 0.16 , $p=0.02$ 、図7)。イリシンの介入による変化量について、介入時期による差があるかを検証したところ、寒くなる時期に運動した群は、暑くなる時期に運動した群、対照群いずれについても有意に高かった(図8)。

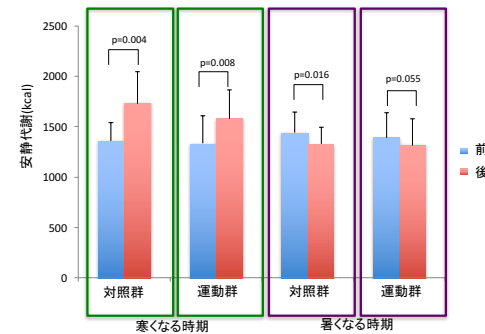


図6. 安静代謝に対する効果と介入時期

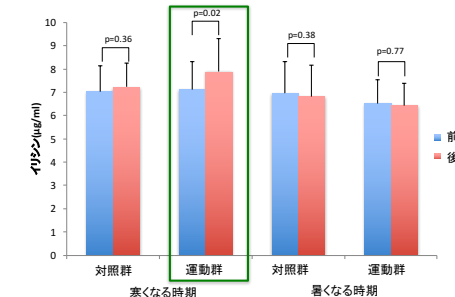


図7. イリシンに対する効果と介入時期

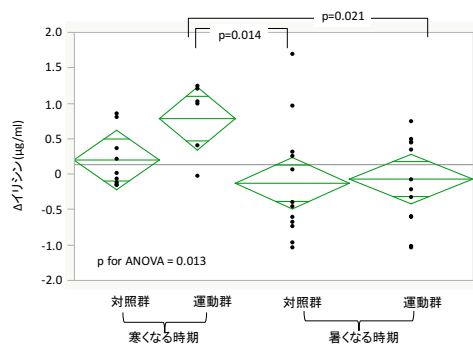
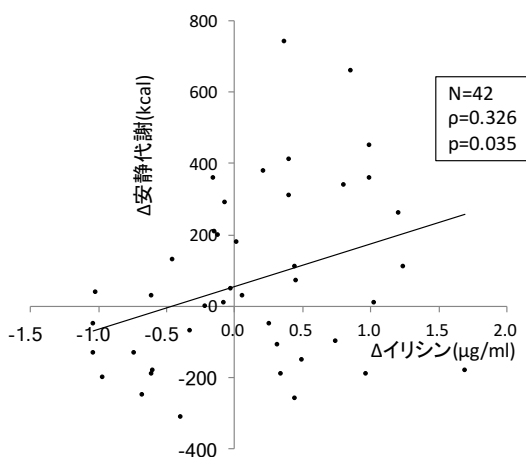


図 8. イリシンの介入による変化量と介入時期

また、研究期間前後のイリシンの変化量と安静代謝の変化量との間に有意な正の相関を認めた ($\rho = 0.33$, $p = 0.04$, 図 9)。



Spearmanの順位相関係数

図 9. イリシンの変化量と安静代謝の変化量との相関

④ 考察

一般に言われているように、安静代謝は寒くなると増加し、暑くなると減少することが再確認された。イリシンの変化量と安静代謝の変化量との間に有意な正の相関が認められており、イリシンと代謝との関連性が示唆される。イリシンは、暑くなる時期には運動による効果を認めなかったが、安静代謝の増加する寒くなる時期には有酸素運動により有意に増加した。運動によるイリシン発現への効果について、一致した見解が出ない理由の一つに、運動介入の時期の違いが関与している可能性が示唆される。

(3) 追加実験：今回用いた ELISA 法による結果とウエスタンブロットによる半定量の結果との関連

2015年3月に Scientific Reports でイリシンの検出において、ELISA 法は交差反応を示す可能性があることが報告された¹¹⁾。

そこで、今回得られたサンプルの一部を用いて、ウエスタンブロット法による半定量と ELISA 法で得られた結果について検証した。

① 方法

サンプル処理は、Boström らの方法⁶⁾に従った。簡潔に述べると以下の通りである：血漿 60μl から IgG/Albumin を除去し (Aurum Serum Protein Mini Kit, Bio-Rad)、遠心濃縮機を用いて 10μg/ml まで濃縮し、PNGase F により脱糖処理を行った (PNGase F, New England Biolabs Japan)。その後、超音波処理を行い沸騰した後に、抗 FNDC5 抗体 (FNDC5 pyclonal antibody, proteintech, 23995-1-AP) を用いてウエスタンブロット法を行った。なお、メンブレン毎の差を解消するため、毎回同じサンプルを流し、標準化を行った。

② 結果

ウエスタンブロット法による結果の一例を図 10 に示す。

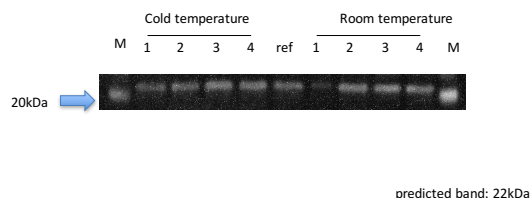


図 10. ウエスタンブロット法による結果 (一例)

事務作業者、常温作業者、寒冷作業者との間にウエスタンブロット法による半定量の結果では、有意な差を認めなかった (p for ANOVA=0.096)。

一方、運動介入の結果では、表 4 が示すとおり、寒くなる時期では、運動介入により約 1.4 倍にイリシンは増加を示し、暑くなる時期では約 1.1 倍、という結果で、対照群については、暑くなる時期ではイリシンは 0.9 倍と低下する方向にあり、傾向性としては、ELISA 法と一致する結果であった。

表 4. 介入時期とイリシンレベルの介入前後比 (介入前に対する後の比率、ウエスタンブロット法)

		平均	標準偏差
寒くなる	運動群	1.39	0.17
	対照群	1.19	0.29
暑くなる	運動群	1.11	0.28
	対照群	0.94	0.09

③ 考察

作業環境についての横断研究の結果では、ELISA 法とウエスタンブロット法による半定量の結果に一致を認めなかったが、介入時期による運動介入の結果については、ほぼ同じ方向性の結果を得た。結論を出すには、今後の更なる検証が必要である。

(4) 結果の総まとめ

環境温度の違いによって、イリシンレベルは異なる可能性が示唆された。寒冷適応に、イリシンが関与していることが示唆された。また、それを裏付けるように、暑くなる時期の運動介入でのイリシンレベルの増加は増加を示さないが、寒くなる時期の運動介入では増加を示した。運動に関する介入研究で一定の結果が得られない原因の一つとして、介入実施時期の違いも影響している可能性が考えられた。

<引用文献>

- ① Ohta M, et al. The effect of lifestyle modification on physical fitness and work ability in different workstyles. J UOEH. 2004 Dec 1;26(4):411-21.
- ② Ohta M, et al. Blood pressure-lowering effects of lifestyle modification: possible involvement of nitric oxide bioavailability. Hypertens Res. 2005;28(10):779-86.
- ③ Ohta M, et al. Effect of Lifestyle Modification Program Implemented in the Community on Workers' Job Satisfaction. Ind Health 2007; 45(1): 49-55.
- ④ Ohta M, et al. Effects of Step Exercise on Leptin Resistance and Oxidative Stress in Elderly Females. Japanese Journal of Cardiovascular Disease Prevention 2008; 42: 55-62. Japanese.
- ⑤ Ohta M, et al. Effects of bench step exercise on arterial stiffness in post-menopausal women: Contribution of IGF-1 bioactivity and nitric oxide production. Growth Horm IGF Res.2012; 22: 36-41.
- ⑥ Boström P, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature 2012; 481: 463-468.
- ⑦ Giacco F, et al. Circ Res. 2010;107(9):1058-1070.
- ⑧ 体温生理学テキスト,文光堂
- ⑨ Ravussin E, et al. Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. J Clin Invest 1986; 78: 1568-1578.
- ⑩ Komatsu M, et al., Multiple roles of PPAR α in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. Genes to Cells 2010; 15: 91-100
- ⑪ Albrecht E, et al. Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. Scientific Reports 2015; 5: 8889.

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 0件)

[学会発表] (計 4件)

- ① 太田雅規、李云善、姜英、江口泰正、河井一明、大和浩、寒冷環境下の労働者と常温環境下の労働者における酸化ストレスとその防御系の違い.第89回日本産業衛生学会, 2016.5, 福島
- ② 太田雅規、姜英、道下龍馬、江口泰正、大和浩、運動会乳児期と新規ホルモン「イリシン」との関係.第17回日本健康支援学会, 2016.2, 名古屋
- ③ 太田雅規、今野由将、江口泰正、大和浩、新規物質「イリシン」と心血管リスクとの関係および運動効果.第50回日本循環器予防学会, 2014.7, 京都
- ④ Ohta M, Eguchi Y, Konno Y, Yamato H. Expression of the novel hormone irisin in cold temperature environments. Wellbeing at Work. May, 2014, Copenhagen, Denmark

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 雅規 (OHTA, Masanori)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：70341526

(2) 研究分担者

大和 浩 (YAMATO, Hiroshi)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：90248592

江口 泰正 (EGUCHI, Yasumasa)

産業医科大学・産業保健学部・准教授

研究者番号：70512185

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし