

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32507

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870553

研究課題名(和文) 運動・食餌制限による肝臓脂肪蓄積予防効果 脂肪組織を介した新規メカニズムの検討

研究課題名(英文) Prevention of hepatic fat accumulation by habitual exercise and dietary restriction: Examination of a novel mechanism via adipose tissue

研究代表者

黒坂 裕香 (Kurosaka, Yuka)

和洋女子大学・生活科学系・助手

研究者番号：30633002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動や食事制限による新たな脂肪肝予防メカニズムを解明することを目的に、脂肪組織の形態や機能に着目して検討をおこなった。食事制限のみでは、脂肪肝が悪化し、食事制限と運動を併用したことにより脂肪肝が改善した。この結果の背景には、脂肪組織のサイズや機能の違いがあることが明らかとなった。食事制限に頼った体重コントロールにより、脂肪蓄積に関連する脂肪組織と肝臓との連関が破綻し、脂肪肝の要因の一つとなる可能性が示唆された。運動を取り入れることで、これらを解決し、脂肪肝を予防できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on adipocyte size and function to elucidate a novel means of preventing fatty liver development by habitual exercise and dietary restriction. Fatty liver development was suppressed by a combination of habitual exercise and dietary restriction, but not by dietary restriction alone. Differences in adipocyte size and function were detected following combination of habitual exercise and dietary restriction versus dietary restriction alone. Weight management strategies that depend solely on dietary restriction may disrupt communication pathways related to fat metabolism between adipose tissue and the liver, thereby promoting the development of a fatty liver. By incorporating exercise, it is possible that this disruption can be avoided, and fatty liver development may be prevented.

研究分野：運動・栄養生理学

キーワード：脂肪肝 肥満 運動習慣 食事制限 脂肪細胞サイズ

## 1. 研究開始当初の背景

特定保健指導の対象者は肥満であることが条件とされているが、近年では非肥満者に対する疾病リスクが高いことも問題とされ、この制度では抜け落ちてしまう非肥満者への対応が検討されている(厚生労働省発表資料)。非アルコール性脂肪肝は、肥満との合併が多いことが知られる一方、非肥満者でも脂肪肝が観察されるケースが存在し、特に日本人にその傾向が強いことが指摘されている。(Azuma K. et al. 2009)。近年、脂肪肝は全身の糖・脂質代謝異常を介して更なる代謝疾患へと繋がることから、単に肥満を防ぐだけでなく、「脂肪肝を回避することの重要性」が認識されている。また、国民健康栄養調査によると我が国では国民の運動不足が指摘され、食生活の改善と同様に健康政策上の重要な課題となっている。「肥満でなくても脂肪肝が観察されるケースが少なくないこと」と、「肥満でなくても身体活動量が不足しているヒトは生活習慣病リスクや死亡率が高いこと(Blair SN. et al. 1989, Lee CD. et al. 1999)」は、外見的な肥満の程度よりも脂肪肝の発症の有無が健康状態に関与し、その成立には運動不足が食生活に並ぶ大きな要因である可能性を示唆する。

先行研究では、脂肪萎縮症マウスにおいて肝臓への過剰な脂肪蓄積が生じていること(Shimomura I. et al. Nature. 1999)や、遺伝子操作により肥満モデルマウスの脂肪組織への脂肪蓄積を抑制すると、肥満は軽減されるが肝臓への脂肪蓄積が亢進すること(Wang M. et al. 2008)が報告されており、脂肪組織に脂肪を蓄積出来ない場合は肝臓に脂肪蓄積が生じることが示唆されている。また、肥満ラットに過剰に蓄積した内臓脂肪を外科的に除去することによって、脂肪肝が改善された(Xia L. et al. 2011)とする報告からは、脂肪組織に脂肪を蓄積する余力をつくることで肝臓への脂肪蓄積が軽減する可能性が示唆されている。これらの先行研究から、申請者は、脂肪-肝クロストーク仮説を着想するに至り、この調節に「運動の有無」が関与するとの仮説を立てて研究を展開することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、肥満・脂肪肝予防のために、運動と食餌制限を併用した場合と、食餌制限のみを実施した場合の肝脂肪蓄積への影響について、脂肪組織の形態や機能を中心に検討し、新たな肝脂肪蓄積予防メカニズムを探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究デザイン

6週齢 Zucker Fatty (ZF)ラットを被検動物とし、肥満(コントロール)群、食餌制限群、食餌制限+運動群に群分けをした(各群 n=6~8)。食餌制限群は、肥満群の70%量に制限

給餌した。食餌制限+運動群は、ZFラットに加負荷式自発運動測定装置にて自発走運動を負荷し、食餌制限群と同じ体重が保てるように制限給餌した。また、非肥満群として、肥満や脂肪肝を発症しない Zucker Lean (ZL)ラットを用いた。

飼料は、げっ歯目動物用固形飼料(NMF:オリエンタル酵母工業)を用い、飲料水は全ての群において、水道水の自由摂取とした。体重、摂餌量、走行距離の計測は毎日同時刻に行った。

全てのラットは、6週間の飼育期間終了時(12週齢時)にイソフルランを用いた全身麻酔下で後大静脈より血液を採取し、心臓を摘出することにより安楽死させた。直ちに摘出した肝臓、精巢上体周囲脂肪、下腿骨格筋は、湿重量を測定後、分析まで-80℃で保存した。採取した血液は、血清を得た後、組織と同様に凍結保存した。

実験は、和洋女子大学動物を対象とする研究に関する倫理委員会により審査され承認を得て実施した(和洋女子大学動物を対象とする実験研究に関する倫理委員会規定 第1015号)。

### (2) 血中成分分析

採取した血液から得た血清に対して、市販の定量キットを用いて各項目の分析を実施した。

### (3) 肝脂肪蓄積の評価

肝中脂肪含有量は、Folchらの方法に従い、肝組織中の脂質抽出を行い、得られた抽出液中のTGを市販の測定キットで定量し、肝組織1gあたりの含有量として算出した。

肝組織のパラフィン切片の作成およびヘマトキシリン・エオジン(HE)染色は、肝組織を20%ホルマリン液で固定後、株式会社エスアールエルに委託した。組織像は、光学顕微鏡を用いて定性的な観察を行った。

肝組織の電子顕微鏡試料の作成は、肝組織片を2.5%グルタルアルデヒド、1%オスミウム酸固定後、エタノール系列で脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡にて加速電圧80kVで観察した。

### (4) 脂肪組織の脂肪細胞サイズの評価

精巢上体周囲脂肪組織のパラフィン切片の作成およびHE染色は、精巢上体周囲脂肪組織を20%ホルマリン液で固定後、株式会社エスアールエルに委託した。組織像は、光学顕微鏡を用いて定性的な観察を行った。

脂肪組織の細胞サイズの比較は、得られたHE染色像を用いて交点間距離法により行った。画像解析ソフト Image J software (version 1.46; National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)にて平行線を画像の上に重ね、平行線と細胞壁が交わる部分を交点としてその距離をソフトウェア上で計測

した。

#### (5) 脂肪肝予防メカニズムの検討

脂肪肝予防メカニズムに関わる因子の分析は、肝および精巢上体周囲脂肪組織を用いて、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法で行った。

#### (6) 統計処理

群間の平均値の差の検定には、一元配置の分散分析を用い、有意なF値が検出された場合には、群間の差を検定するために、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。いずれも、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 運動習慣と食餌制限が肝脂肪蓄積に及ぼす影響

実験期間中の肥満群の体重は著しい増加を示したのに対し、食餌制限群と食餌制限 + 運動群の体重増加は抑制され、緩やかな増加であった。最終体重において、食餌制限群と食餌制限 + 運動群の体重に有意がないことが確認され、肥満群と比較して有意に低値であった。また、食餌制限群と食餌制限 + 運動群の体重を同等に保てるよう餌の量を調節した結果、両群の餌の摂取量に有意な差は認められなかった。このことから、食餌制限群 + 運動群で実施した習慣的な運動は、体重の減少には貢献しないレベルのものであったと考えられた。一方、下肢骨格筋の筋湿重量は、肥満群と食餌制限群に比較して、食餌制限 + 運動群で有意に増加をしており、本研究の習慣的な運動のモデルとして用いた自発走運動は、体重には影響を及ぼさないもの、下肢骨格筋量の増加を促すものであったことが確認された。

このような条件にて実施された本研究において、肝組織中のトリグリセライド含有量は、肥満群に比較し食餌制限群で有意に高値を示し、食餌制限 + 運動群で有意に低値を示した。また、食餌制限群に比較し食餌制限 + 運動群は有意に低値を示した。光学顕微鏡観察、電子顕微鏡観察において同様の傾向が観察された。

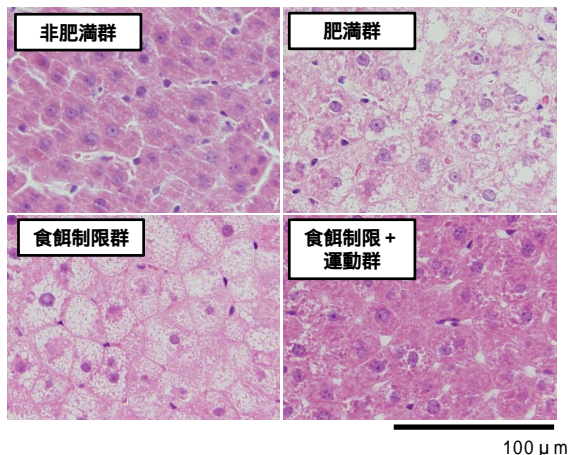


図1. 肝 HE 染色像

すなわち、食餌制限単独の実施では、肝脂肪蓄積が進行し、食餌制限と運動の併用により肝脂肪蓄積は抑制された。したがって、食餌制限 + 運動群に観察された肝脂肪蓄積抑制効果は運動習慣によるものであると推測された。

#### (2) 運動習慣と食餌制限が脂肪細胞サイズに及ぼす影響

食餌制限群と食餌制限 + 運動群の精巢上体周囲の脂肪組織の脂肪細胞サイズの分布の比較を行った。食餌制限群では、大型の脂肪細胞が多く観察され、食餌制限 + 運動群は、小型の脂肪細胞が多く観察された。脂肪細胞サイズの平均値を比較すると、食餌制限 + 運動群では、肥満群と食餌制限群に比較して肥大化が有意に抑制された。食餌制限群と食餌制限 + 運動群では、体重と脂肪組織重量に差がなかったものの、脂肪組織の脂肪細胞の形態が異なり、運動習慣により脂肪細胞サイズの肥大化が抑制されることが明らかとなった。

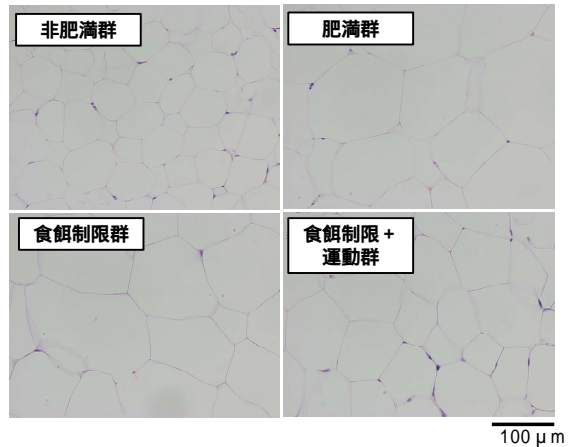


図2. 精巢上体周囲脂肪組織の HE 染色像

この結果は、脂肪細胞の肥大化ではなく、脂肪細胞数の増加により脂肪組織全体が増量した場合は、異所性脂肪蓄積は進行しない (Slawik M. et al. 2007, Hoffstedt J. et al. 2010) とする先行研究の結果を支持した。

#### (3) 運動習慣と食餌制限により影響を受ける脂肪組織を介した脂肪肝予防メカニズムの検討

脂肪細胞内に蓄積された TG の分解に関しては、ATGL, pHSL, MAGL が律速酵素として同定されている。また、この分解過程において生じた FFA は、血中に分泌される。精巢上体周囲脂肪組織の ATGL と MAGL のタンパク質発現量は、食餌制限群に比較して食餌制限 + 運動群で有意に低値であった。血中遊離脂肪酸濃度は、食餌制限群に比較し、食餌制限群で有意に低値であった。このことから、脂肪組織での TG に対する脂肪分解反応は、食餌制限群で促進されていることが推測され、血中遊離脂肪酸の増加は、それに起因したものと考えられた。

また、肝に蓄積される脂肪の約 60%は脂肪細胞で分解されて血中に分泌された FFA 由来であることが知られている (Donnelly KL. et al. 2005.). 肝組織において脂肪酸の細胞内への取り込みを制御する FAT/CD36 タンパク質発現は、食餌制限群に比較して食餌制限 + 運動群で有意に低値であった。このことから、食餌制限群で肝脂肪取込能が高い可能性が示唆され、脂肪肝の進行を促進した可能性が考えられた。極度に肥大化した脂肪細胞では、単一脂肪細胞内への更なる脂肪蓄積が難しく、血中 FFA の増加を介し肝臓へ蓄積する量が増加すると考えられた。

以上の結果から、脂肪組織と肝臓のクロストークが食餌制限に頼った体重コントロールにより破綻する事が脂肪肝の要因の一つであり、運動の実施がそれを解決するとの知見を得た。本研究で明らかとなった脂肪組織と脂肪肝に関する新たな知見は、脂肪肝の予防には、食事コントロールだけに頼るのではなく、適度な運動が重要であることをサポートするものである。これらの結果は、運動の実施の重要性、理想的な食習慣の提案のみならず、やせ願望や極度な食事制限に対する提言、運動または食事制限により痩せたことの本質的な違いなどを説明すると考えられる。

#### 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 3 件)

Kurosaka Y, Yamauchi H, Takemori S, Minato K. Protective effects of dietary restriction and physical exercise on intrahepatic fat accumulation. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*. 7 (1) 9-14. 2018. DOI: 10.7600/jpfsm.7.9 (査読あり)

Kurosaka Y, Shiroya Y, Yamauchi H, Kitamura H, Minato K. Characterization of fat metabolism in the fatty liver caused by a high-fat, low-carbohydrate diet: A study under equal energy conditions. *487 (1) 41-46*. 2017. BBRC. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.010. (査読あり)

Kurosaka Y, Shiroya Y, Yamauchi H, Kaneko T, Okubo Y, Shibuya K, Minato K. Effects of habitual exercise and dietary restriction on intrahepatic and periepididymal fat accumulation in Zucker fatty rats. *BMC Research Notes*. 8 121. 2015. DOI: 10.1186/s13104-015-1063-6. (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

黒坂裕香, 北村裕美, 山内秀樹, 代谷陽子, 湊久美子. 脂肪摂取量の違いが肝脂肪蓄積と血中リポタンパク質に及ぼす影響. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 沖縄. 2017 年 5 月.

黒坂 裕香, 北村裕美, 山内秀樹, 山内秀樹, 代谷陽子, 湊久美子. 高脂肪食誘導型脂肪肝に対する自発走運動の影響. 第 23 回日本健康体力栄養学会大会 神戸. 2016 年 3 月.

Kurosaka Y, Yamauchi H, Shiroya Y, Minato K. Differential effects of dietary restriction and exercise on lipolysis capacity in white adipose tissue. 12th Asian Congress of Nutrition. Yokohama, JPN. May. 2015.

黒坂裕香. 高脂肪低炭水化物食摂取により促進される肝脂肪蓄積の分子機構の検討. 第 36 回日本肥満学会. 名古屋. 2015 年 10 月.

黒坂裕香, 山内秀樹, 代谷陽子, 金子健彦, 北村裕美, 難波秀行, 湊久美子. 運動・食事制限による肝脂肪蓄積改善効果と脂肪組織との関連. 第 69 回日本体力医学会大会. 長崎. 2014 年 9 月

Kurosaka Y, Kitamura H, Yamauchi H, Shiroya Y, Nanba H, Minato K. Effects of habitual exercise and diet restriction on the expression of hepatic carnitine palmitoyl-CoA transferase-1 in Zucker fatty rats. 19th Annual Congress of the European College of Sport Science. Amsterdam, NED. July. 2014.

黒坂裕香, 北村裕美, 山内秀樹, 代谷陽子, 湊久美子. 脂質摂取量の違いが肝脂肪酸合成に及ぼす影響 等エネルギー摂取条件での比較 -. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会. 札幌. 2014 年 6 月.

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒坂 裕香 (KUROSAKA Yuka)  
和洋女子大学 生活科学系 助手  
研究者番号：30633002

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

湊 久美子 (MINATO Kumiko)  
代谷 陽子 (SHIROYA Yoko)  
山内 秀樹 (YAMAUCHI Hideki)