

運動による白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞への分化とその調節機構

大野 秀 樹 石 田 均¹ 高 橋 和 人¹
木 崎 節 子 櫻 井 拓 也 小 笠 原 準 悦

杏林大学医学部衛生学公衆衛生学

¹ 杏林大学医学部第三内科学教室

緒 言

哺乳動物の脂肪細胞は、大きく白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞に分けられる。前者は中性脂肪の形で余剰エネルギーを貯蓄するのに対して、後者はミトコンドリア内膜にある UCP-1 の作用を介して熱産生を生じエネルギー消費を誘導する。最近、健康な成人において褐色脂肪組織量と体脂肪量とが逆相関し、褐色脂肪組織は PET-CT 検査でがん組織と間違えられるほど全身に存在することが明らかとなった¹⁻³⁾。ほぼ同時期に、Myf-5 遺伝子を発現する骨格筋前駆細胞は褐色脂肪細胞へと分化することが見出され、転写調節因子である PRDM16 や脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ や C/EBP-b の作用が中心的な役割を果たすことが明らかとなっている^{4,5)}。さらに、骨格筋前駆細胞のみならず、成熟した白色脂肪細胞もまた褐色脂肪細胞様の細胞へ変化することが報告された^{6,7)}。こうして、褐色脂肪細胞のエネルギー消費能を介した抗肥満療法の確立が期待されるようになった。

運動は肥満症の予防や治療に有用なツールとなる視点から、従来、臨床の現場でも汎用されている。我々の研究から、中強度の持久的な運動は、白色脂肪細胞径や数の減少⁸⁻¹⁰⁾、脂肪分解効率¹¹⁾ やアドレナリン作動薬に対する反応性の亢進^{12,13)}、ならびに寒冷環境への順応や寒冷暴露による自然免疫能の低下¹⁴⁾ の改善に有効である^{15,16)} 知見が得られており、運動は白色脂肪細胞の代謝応答や免疫細胞における生理応答の亢進に極めて有

用であることが明らかとなっている。興味深いことに、PPAR γ のアゴニスト刺激は、成熟した白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化を誘導し¹⁷⁾、これは、一部、アドレナリン受容体を介した細胞内情報伝達経路の活性化によって調節される^{6,7)}。運動は、白色脂肪細胞のアドレナリン受容体に対する機械的応答を亢進させる¹²⁾ ことから、白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化を修飾する可能性がある。本研究では、白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞への分化機構における運動の効果について、調節因子群の変化を中心に検討した。

方 法

C57BL マウスは、寒冷曝露による褐色脂肪細胞の活性化や骨格筋前駆細胞からの褐色脂肪細胞化の検討に汎用されている。そのため、本研究のポジティブコントロールとして応用できる。そこで、C57BL マウス (8 週齢) を非運動群と水泳運動群 (35°C, 60 分間)、走運動群 (60 分間) とに分け、骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化能に対する急性運動の効果について検討した。一方、継続的な持久的な身体トレーニングでは、白色脂肪組織量は著しく減少する。そのため、マウスを用いた検討ではより多くの個体が必要となる。そこでマウスと比べて白色脂肪組織量の豊富な Wistar 雄性ラット (5 週齢より飼育開始) をランダムに非運動群と運動トレーニング群とに分け、運動トレーニングモデルを作製した。運動負荷として、時間と速度を漸増させる週 5 日、計 9 週間のト

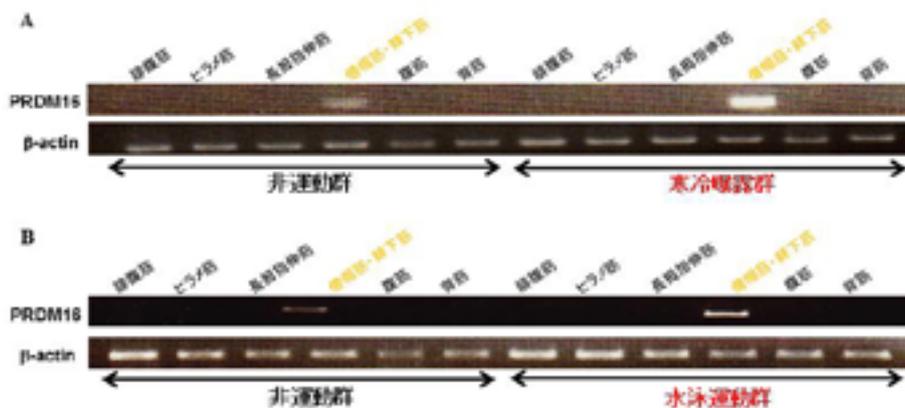


図1 (A) 寒冷曝露, (B) 水泳運動による骨格筋の PRDM16 mRNA 発現を示す。

レッドミル走行を実施した。

マウスより、腓腹筋、ヒラメ筋、長拇指伸筋、僧帽筋・棘下筋（肩甲骨周囲骨格筋群）、直腹筋、広背筋を摘出し試料とした。ラット副睾丸脂肪組織を摘出後、既報¹¹⁾に準じて脂肪細胞を単離した。単離した脂肪細胞を 1 mg/ml のコラゲナーゼ type1 と 200 nM のアデノシンを含む Krebs リン酸緩衝液に浮遊させ、37°C の恒温条件下で 30 分間インキュベートし、生理機能の観察などに用いた。HeLa 細胞¹⁸⁾は、抗生物質(100 mg/ml ペニシリン、100 U/ml ストレプトマイシン)と 10% 子牛血清を含む DMEM に懸濁し、37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。マウス骨格筋とラット単離脂肪細胞から total RNA を調製し、逆転写酵素を用いて cDNA を調製後、RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。骨格筋組織と単離脂肪細胞、HeLa 細胞を回収後、プロテアーゼ阻害剤と脱リン酸化酵素阻害剤を含む緩衝液へと懸濁し、遠心分離を経て細胞ライセートを調製した。タンパク質の発現はウエスタンブロット法を用いて検出し、タンパク質間の結合は免疫沈降法により検出した。発現ベクターの作製、siRNA と発現ベクターの遺伝子導入法などを含む分子生物学手技は、常法を一部改変して行った。

結 果

1) 骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化に及ぼす急性運動の効果

褐色脂肪細胞のマーカーである UCP-1 や分化の調節因子である PRDM16 の mRNA 発現は、腓腹筋、ヒラメ筋、長拇指伸筋などの下肢骨格筋群や直腹筋、広背筋などの体幹の骨格筋群では認められず、僧帽筋・棘下筋（肩甲骨周囲骨格筋群）のみに観察された（図1）。非運動群と比べて、寒冷曝露群と水泳運動群は PRDM16 の mRNA とタンパク質の発現を有意に増加させたが、走運動群に有意な変化は生じなかった。同様に、PRDM16 機能の補助因子である C/EBP-b や PGC1-a mRNA の発現、ならびに PRDM16 の活性化に必須な PRDM16 と C/EBP-b とのタンパク質の結合も寒冷曝露群と水泳運動群

で有意に増加し、これらの変化は褐色脂肪細胞のマーカーである UCP-1 や Cidea mRNA 発現の変化と一致した。急性運動は、肩甲骨周囲骨格筋群の褐色脂肪細胞化機構を修飾することが示唆され、有効性が確認された。現在、上記のメカニズムを検討するために DNA アレイ解析を行っている。

2) 運動トレーニングによる白色脂肪細胞の PPAR γ への修飾作用

継続的な運動はさまざまな細胞に生理・生化学的な適応変化を生じる。本研究で作成した運動トレーニングラットの白色脂肪細胞では、非運動群と比べて基礎値とアゴニスト（イソプロテレノール）刺激による脂肪分解反応の亢進や、脂肪分解酵素である ATGL タンパク質の発現の増加などが観察され、運動トレーニングによる適応変化が示唆された。白色脂肪細胞を PPAR γ のアゴニストで刺激すると、白色細胞の褐色脂肪細胞化が誘導される¹⁷⁾ことから、PPAR γ の変化は白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化のマーカーとなる可能性も考えられる。加えて、PPAR γ は本研究で発現の増加した ATGL 分子のプロモーター領域に結合配列を有する¹⁹⁾ことから、ATGL の発現変化は、PPAR γ の生理活性作用の指標となるかもしれない。実際、内因性に ATGL タンパク質を発現する HeLa 細胞に、全長 PPAR γ を組み込んだ pCMV-myc-PPAR γ ベクターを遺伝子導入すると、ATGL タンパク質の発現は有意に増加し、これは PPAR γ の siRNA との共遺伝子導入によって有意に抑制される（図2）²⁰⁾。そこで、運動トレーニングによる白色脂肪細胞の PPAR γ の変化について観察すると、PPAR γ の mRNA、タンパク質、核内の活性型タンパク質の発現は有意に増加し、PPAR γ と DNA との結合も著しく増加した（図3）²⁰⁾。さらに、PPAR γ のアゴニストであるロシグリタゾンの添加は、ATGL タンパク質発現のさらなる増加を誘導し、この状態では ATGL の生理作用である脂肪分解反応の有意な亢進も観察された。こうして、運動トレーニングは PPAR γ の生理作用を増幅させ、PPAR γ の作用を介した

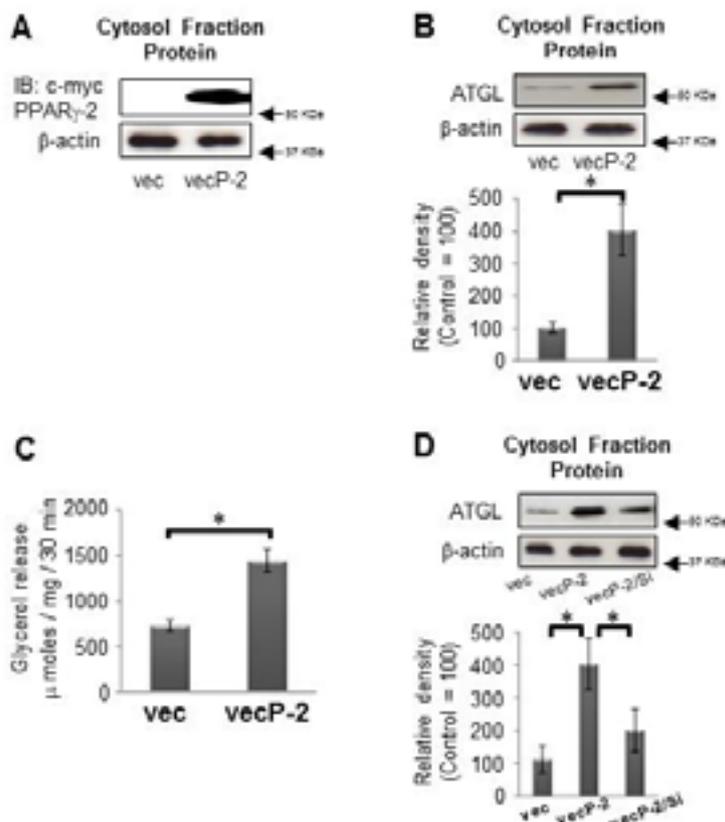


図2 (A) HeLa 細胞へ過剰発現させた PPAR γ -2 タンパク質を示す²⁰⁾。(B) PPAR γ -2 タンパク質の過剰発現によって ATGL タンパク質は増加し、(C) ATGL の生理作用であるグリセロールの放出が増加する。(D) PPAR γ siRNA の導入によって ATGL の発現は抑制される。vec: 疑似ベクター, vecP-2: PPAR γ -2 ベクター, vecP-2/Si: PPAR γ -2 ベクターおよび PPAR γ siRNA, * P < 0.05 対 vec および vecP-2。

褐色脂肪細胞化を促進する可能性が示された。

考察および今後の検討課題

本研究の結果は、急性運動と運動トレーニングのいずれも、骨格筋前駆細胞や白色脂肪細胞からの褐色脂肪細胞化の過程を修飾する可能性を示唆している。骨格筋前駆細胞の褐色脂肪細胞化は PRDM16 が、白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化には PPAR γ が関与するらしい。しかし、最近では、白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化は両細胞に共通した前駆細胞より誘導されるのではなく、成熟した白色脂肪細胞が褐色脂肪細胞の機能を有した細胞へと変化したに過ぎないという報告^{17,21)}もあり、骨格筋前駆細胞より形成される褐色脂肪細胞とは起源が異なることが指摘されている。果たして、運動は脂肪細胞前駆細胞から褐色脂肪細胞を誘導するのか、それとも成熟白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞様の細胞を形成する過程を促進するだけなのか、についての議論には、今後のさらなる検討が必要である。

引用文献

1. van Marken Lichtenbelt WD, et al.: N Engl J Med 360: 1500-1508, 2009.
2. Cypess AM, et al.: N Engl J Med 360:1509-1517, 2009.
3. Virtanen KA, et al.: N Engl J Med 360:1518-1525, 2009.
4. Seale P, et al.: Nature 454: 961-968, 2008.
5. Kajimura S, et al.: Nature 460: 1154-1158, 2009.
6. Vegiopoulos A, et al.: Science 328: 1158-1161, 2010.
7. Madsen L, et al.: PLoS One 5: e11391, 2010.
8. Miyazaki S, Ohno H, et al.: Life Sci 86: 691-698, 2010.
9. Hatano D, Ohno H, et al.: Scand J Med Sci Sport 21:e115-e121, 2011.
10. Sakurai T, Ohno H, et al.: Biochem Biophys Res Commun 379: 605-609, 2009.
11. Ogasawara, J, Ohno H, et al.: Biochem Biophys Res Commun 400: 134-139, 2010.
12. Ogasawara J, Ohno H, et al.: FASEB J 20: 350-352, 2006.
13. Ogasawara J, Ohno H, et al.: Biochem Biophys Res Commun 323:1109-1115, 2004.
14. Kizaki T, Ohno H, et al.: Endocrinology 137: 4260-4267, 1996.
15. Kizaki T, Ohno H, et al.: Med Sci Sports Exerc 32: 143-148, 2000.

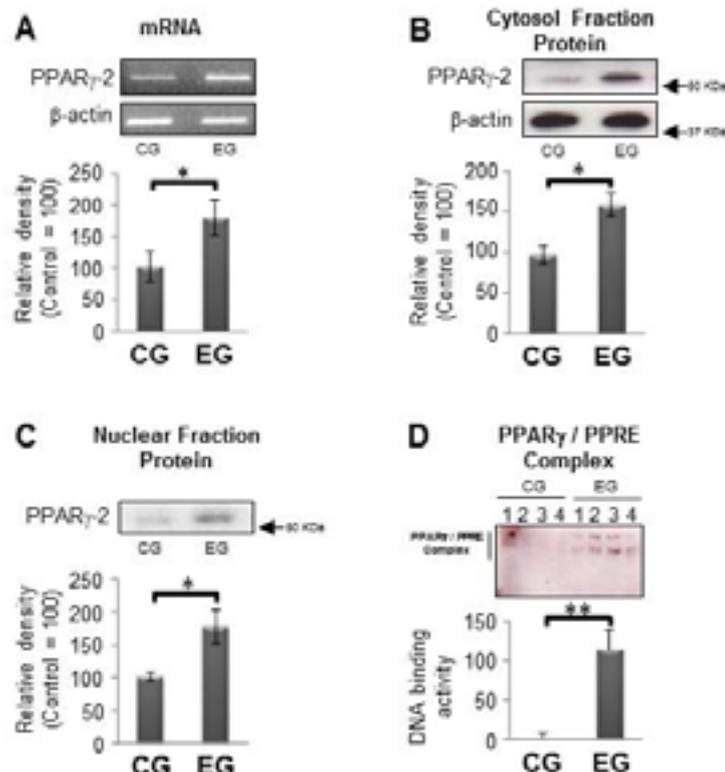


図3 運動トレーニングによって、白色脂肪細胞の PPAR γ の (A) mRNA, (B) タンパク質, (C) 核内タンパク質の発現は有意に増加し, (D) PPAR γ と DNA 上の結合配列との結合は著増する²⁰。CG: コントロール群, EG: 運動トレーニング群, * P < 0.05, ** P < 0.01 対コントロール群。

16. Kizaki T, Ohno H, et al.: *Biochem Biophys Res Commun* 372: 152-156, 2008.
17. Petrovic N, et al.: *J Biol Chem* 285:7153-7164, 2010.
18. Smirnova E, et al.: *EMBO Rep* 7:106-113, 2006.
19. Kershaw EE, et al.: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1736-E1745, 2007.
20. Ogasawara J, Ohno H, et al.: *PLoS One* 7: e40876, 2012.
21. Lehr L, et al.: *Int J Obes (Lond)* 33:680-686, 2009.

List of Publications

1. Ohno H, Shirato K, Sakurai T, Ogasawara J, Sumitani Y, Sato S, Imaizumi K, Ishida H, and Kizaki T: Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *J Phys Fit Sports Med* 1: 5-16, 2012.
2. Kizaki T, Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Imaizumi K, Izawa T, Nagasawa J, Saitoh D, Haga S and Ohno H: The effects of exercise on macrophage function. *J Phys Fit Sports Med* 1: 113-124, 2012.
3. Sato S, Shirato K, Kizaki T, Ohno H, Tachiyashiki K, and Imaizumi K: Effects of β_2 -agonists and exercise on β_2 -adrenergic receptor signaling in skeletal muscles. *J Phys Fit Sports Med* 1: 139-144, 2012.
4. Shirato K, Kizaki T, Ohno H, and Imaizumi K: Effects of exercise on the hexosamine biosynthetic pathway and glycosylation. *J Phys Fit Sports Med* 1: 145-150, 2012.
5. Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Ishibashi Y, Fujiwara T, Akagawa K, Izawa T, Radák Z, and Ohno H: Exercise training and the promotion of neurogenesis and neurite outgrowth in the hippocampus. *J Phys Fit Sports Med* 1: 333-337, 2012.
6. Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T, Takahashi K, Ishida H, Izawa T, Toshinai K, Nakano N, and Ohno H: Effect of physical exercise on lipolysis in white adipocytes. *J Phys Fit Sports Med* 1: 351-356, 2012.
7. Izawa T, Ogasawara J, Sakurai T, Nomura S, Kizaki T, and Ohno H: Recent advances in the adaptations of adipose tissue to physical activity. *J Phys Fit Sports Med* 1: 381-387, 2012.
8. Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nuno H, Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, and Ohno H: Copy number variations due to large genomic deletion in x-linked chronic granulomatous disease. *PLoS One* 7: e27782, 2012.
9. Son HJ, Kim HJ, Kim JH, Ohno H, and Kim CK: Erythropoietin, 2,3 DPG, oxygen transport capacity, and altitude training in adolescent Alpine skiers. *Aviat Space Environ Med* 83: 50-53, 2012.
10. Miyokawa-Gorin K, Takahashi K, Handa K, Kitahara A, Sumitani Y, Katsuta H, Tanaka T, Nishida S, Yoshimoto K, Ohno H, and Ishida H: Induction of mitochondrial uncoupling enhances VEGF₁₂₀ but reduces MCP-1 release in mature 3T3-L1 adipocytes: Possible regulatory mechanism through endogenous ER stress and AMPK-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 200-205, 2012.

11. Hatano D, Ogasawara J, Endoh S, Sakurai T, Nomura S, Kizaki T, Ohno H, Komabayashi T, and Izawa T: Effect of exercise training on the density of endothelial cells in the white adipose tissue of rats. *Scand J Med Sci Sports* 21: e115-e121, 2011.
12. Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Ishibashi Y, Fujiwara T, Akagawa K, Izawa T, Oh-ishi S, Haga S, and Ohno H: Involvement of leucine zipper transcription factor-like protein 1 (Lztf1) in the attenuation of cognitive impairment by exercise training. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 125-129, 2011.
13. Kizaki T, Maegawa T, Sakurai T, Ogasawara J, Ookawara T, Oh-ishi S, Izawa T, Haga S, and Ohno H: Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 413: 454-459, 2011.
14. Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Nakashima M, Hara E, Ohno H, Seki S, and Saitoh D: Augmented bacterial elimination by Kupffer cells after IL-18 pretreatment via IFN- γ produced from NK cells in burn-injured mice. *Burns* 37: 1208-1215, 2011.
15. 長澤純一, 内藤祐二郎, 杉山康司, 笹尾真美, 曾我部健, 新美敬太, 野口いづみ, 芳賀脩光, 石橋義永, 木崎節子, 大野秀樹: 富士登山時の自律神経応答と身体の電気伝導率. *登山医学* 31: 145-152, 2011.
16. 笹尾真美, 野口いづみ, 新美敬太, 曾我部健, 井出正道, 高野宏二, 杉山康司, 長澤純一, 大野秀樹: 高度が味覚感度へ及ぼす影響—富士山における味覚定性定量検査—. *登山医学* 31: 127-131, 2011.
5. Sakurai T, Kidatate K, Nishioka H, Wakame K, Fujii H, Ogasawara J, Kizaki T, Ishibashi Y, Fujiwara T, Akagawa K, Nakano N, Izawa T, and Ohno H: Preventive effects of Oligonol on cognitive impairment in senescence-accelerated mice and identification of its molecular target in hippocampus. 第19回統合医療機能性食品国際会議, 札幌, 平成23年10月15~16日. (「Best Research Award 2011」受賞)
6. 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 石橋義永, 炭谷由計, 井澤鉄也, 宮崎裕美, 大石修司, 芳賀脩光, 大野秀樹: 骨格筋から褐色脂肪細胞への分化機構に及ぼす寒冷曝露と水泳運動の効果. 第66回日本体力医学会大会, 下関, 平成23年9月16~18日.
7. 町田正直, 武田紘平, 横野裕行, 池宗佐知子, 北岡 祐, 大野秀樹, 武政 徹: 筋委縮時におけるリボゾームRNA合成低下を引き起こす因子の検討. 第66回日本体力医学会大会, 下関, 平成23年9月16~18日.
8. 櫻井拓也, 小笠原準悦, 木崎節子, 井澤鉄也, 長澤純一, 芳賀脩光, 大野秀樹: 運動は老化促進モデルマウスの認知機能障害を予防する. 第19回日本運動生理学会大会, 徳島, 平成23年8月25~26日.
9. 小笠原準悦, 北館健太郎, 西岡 浩, 藤井 創, 櫻井拓也, 木崎節子, 石橋義永, 炭谷由計, 石田 均, 井澤鉄也, 大野秀樹: 脂肪細胞の脂肪分解反応に及ぼす新規カテキン型ポリフェノール複合体 Oligonol の効果. 第21回体力・栄養・免疫学会大会, 東京, 平成23年8月27~28日. (「倉掛賞」受賞)
10. 大野秀樹 (講演): 人生をアクティブに送るコツ・・・登山と恋愛の効能. 第1回東京伝統生薬研究会, 東京, 平成23年7月3日.
11. 笹尾真美, 野口いづみ, 新美敬太, 曾我部健, 井出正道, 高野宏二, 杉山康司, 長澤純一, 大野秀樹: 高度が味覚へ及ぼす影響—富士山における味覚定性定量検査—. 第31回日本登山医学会学術集会, 東京, 平成23年6月11~12日.
12. 長澤純一, 内藤祐二郎, 杉山康司, 笹尾真美, 曾我部健, 新美敬太, 野口いづみ, 大野秀樹: 富士登山時の自律神経応答と身体の電気伝導率. 第31回日本登山医学会学術集会, 東京, 平成23年6月11~12日.
13. 満尾 正, 中野重徳, 吉田正雄, 大野秀樹: 抗加齢医療における血中ビタミンD濃度とPTH濃度との関係. 第11回日本抗加齢医学会総会, 京都, 平成23年5月27~29日.
14. 根本浩一郎, 西川哲男, 中館俊夫, 大野秀樹: 糖尿病発症予防研究における睡眠時間と睡眠の質の検討. 第84回日本産業衛生学会, 東京, 平成23年5月18~20日.
15. 高橋和人, 五林可織, 半田桂子, 北原敦子, 田中利明, 勝田秀紀, 西田進, 吉元勝彦, 大野秀樹, 石田 均: 脂肪細胞肥大化にともなう低酸素非依存的 VEGF 分泌制御機構の解析. 第65回日本栄養・食糧学会大会, 東京, 平成23年5月13~15日.

講 演

1. 櫻井拓也, 北館健太郎, 西岡 浩, 若命浩二, 藤井 創, 小笠原準悦, 木崎節子, 藤原智徳, 赤川公朗, 大野秀樹: Oligonol は神経細胞において小胞体ストレス減弱作用をもつ. 第82回日本衛生学会学術総会, 京都, 平成24年3月24~26日.
2. 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 石橋義永, 炭谷由計, 井澤鉄也, 石田 均, 鈴木健二, 芳賀脩光, 大野秀樹: 水泳運動は骨格筋前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化シグナルを促進する. 第82回日本衛生学会学術総会, 京都, 平成24年3月24~26日.
3. 櫻井拓也, 北館健太郎, 西岡浩, 若命浩二, 藤井創, 小笠原準悦, 石橋義永, 木崎節子, 藤原智徳, 赤川公朗, 炭谷由計, 石田 均, 芳賀脩光, 大野秀樹: Oligonol は神経細胞において小胞体ストレスを減弱させる. 第9回日本予防医学会学術総会, 東京, 平成23年11月19~20日.
4. 小笠原準悦, 櫻井拓也, 木崎節子, 炭谷由計, 高橋和人, 石田 均, 木本紀代子, 大野秀樹: 運動は骨格筋から褐色脂肪細胞への分化を活性化するか. 第40回杏林医学会総会, 三鷹, 平成23年11月19日.