

**運動意欲と食リズムのクロストーク：
摂食促進ホルモン・グレリンによる自発運動量制御機構の解明**

久留米大学 田尻 祐司
(共同研究者) 同 御船 弘治
同 満園 良一
同 兎島 将康

**Crosstalk between Spontaneous Exercise and Eating Rhythm:
A Putative Mechanism in Relation to Ghrelin, an Eating Promotion Hormone**

by

Yuji Tajiri

*Division of Endocrinology and Metabolism,
Kurume University School of Medicine*

Hiroharu Mifune

*Institute of Animal Experimentation,
Kurume University School of Medicine*

Ryoichi Mitsuzono

Institute of Health and Sports Science, Kurume University

Masayasu Kojima

*Department of Molecular Genetics, Institute of Life Sciences,
Kurume University*

ABSTRACT

Beneficial effects of exercise on the prevention and treatment of life-style related disease are well known, affecting physiologically active molecules such as ghrelin. Because long-term effects of exercise on ghrelin dynamics are to be elucidated in

relation to the formation of obesity, we investigated effects of spontaneous exercise on these parameters in high-fat diet (HFD) induced obese rats.

Male Sprague Dawley rats at 4 weeks-old were fed either control diet (CD; 10 kcal% fat) or HFD (60 kcal% fat) for 12 weeks. They were further subdivided into 4 groups according to the performance of spontaneous exercise (in the chamber equipped with running-wheel for 3 days, biweekly) or not. In results, CD without exercise (CD-S), CD with exercise (CD-Ex), HFD without exercise (HFD-Ex) and HFD-with exercise (HFD-Ex) were compared at 16 week-old.

Although body weight and visceral fat were significantly higher in HFD-S than CD-S, the induction of spontaneous exercise to HFD rats restored these parameters equivalent to the level of CD-Ex. Abnormal rhythms of activity and feeding were observed in HFD-S, which had been normalized by spontaneous exercise. Furthermore, spontaneous exercise restored plasma and stomach ghrelin concentrations and ghrelin production which had been significantly reduced in HFD-S.

It is shown that spontaneous exercise has an effect to suppress the formation of HFD-induced obesity, normalizing activity and feeding rhythms and restoring ghrelin synthesis.

要 旨

運動療法は生活習慣病の予防や治療において有効であり、末梢性の様々な生理活性物質に影響を及ぼすと言われている。その一つである摂食促進ホルモン・グレリンの分泌が運動前後において変化することが報告されているが、長期の運動習慣導入後のグレリン動態および肥満との関連については不明な点も多い。そこで今回、高脂肪食負荷後の肥満モデルラットにおけるグレリン動態や肥満形成に及ぼす自発運動の効果を検討した。SD ラットを用い、4 週齢時から 12 週間高脂肪食 (HFD; 60 kcal% fat) を給与した肥満モデルラットとコントロール食 (CD; 10 kcal% fat) を同期間給与した正常ラット各々に 6 週齢時から隔週 3 日間の回転かご付エネルギー代謝測定用チャンバー内にて飼育した自発運動群 (HFD-Ex, CD-Ex)、通常ケージ内で飼育した非運動群 (HFD-S,

CD-S) の 4 群を作成し、グレリン動態、体重増加、エネルギー代謝等を比較した。HFD-S 群は CD-S 群に比べて 16 週齢の時点で有意の体重や内臓脂肪量の増加を認めたが、自発運動の導入により HFD-Ex 群におけるこれらの指標は CD-Ex 群と同等のレベルまで減少した。HFD-S 群では活動リズムや摂餌リズムの異常が認められたが、自発運動の導入後はこのリズム異常はほぼ正常化した。HFD-S 群では血漿や胃のグレリン濃度の有意な低下を認めたが、自発運動の導入により血漿グレリン濃度やグレリン産生能が回復した。自発運動習慣は高脂肪食下の肥満におけるグレリン分泌異常を是正し、活動リズムや食リズム異常を正常化し、同時に肥満を抑制することが示された。

緒 言

定期的な運動習慣は生活習慣病の予防や治療において有効である。肥満はインスリン抵抗性を

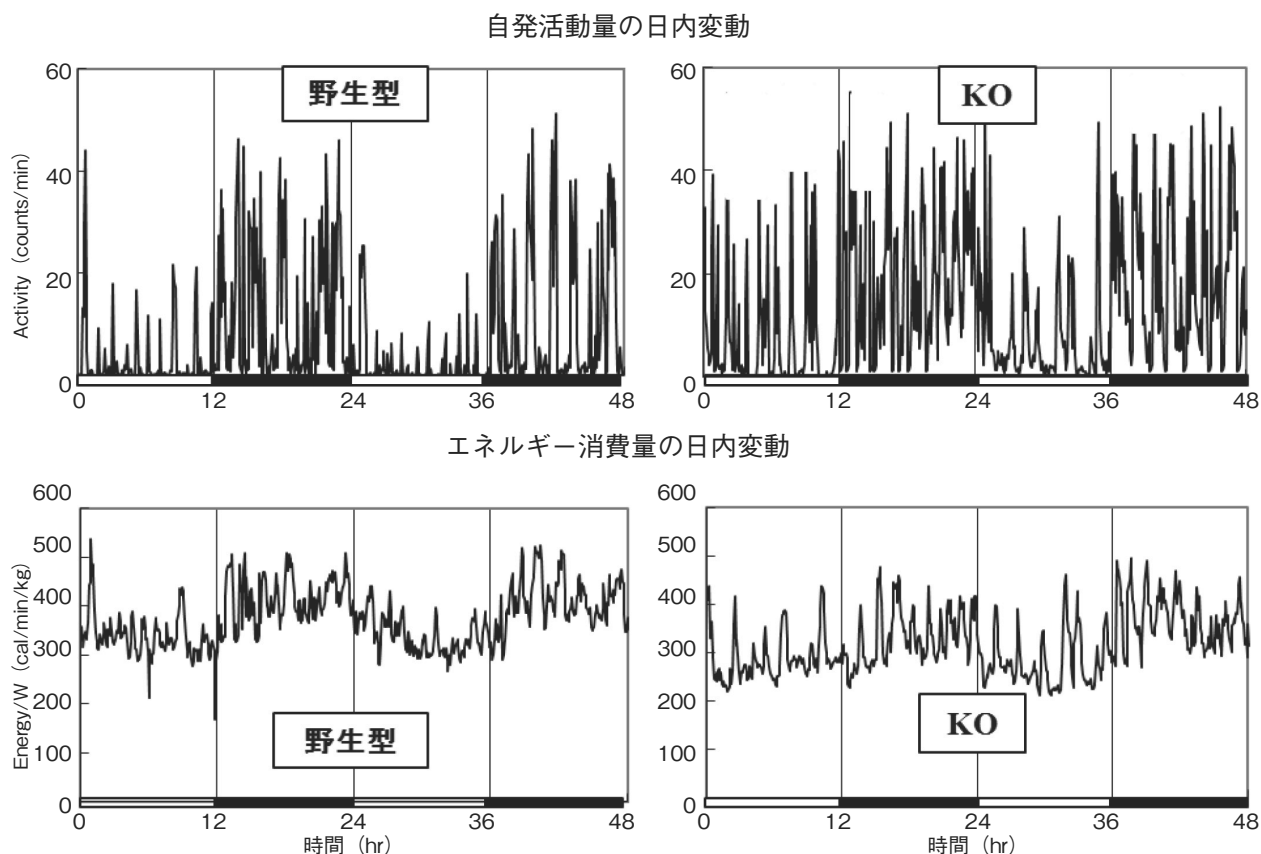


図1 野生型およびグレリン・ノックアウトマウスの自発活動量，エネルギー消費量の日内変動

惹起し，糖尿病，高血圧など多くの生活習慣病の原因となる。肥満者には“食行動のずれとくせ”すなわち食リズム異常がしばしば認められる¹⁾。この特徴的な食行動のずれは“むちゃ喰い障害 (binge eating)”と表現され，肥満治療を困難なものとしている大きな原因である。一方，肥満者に定期的な運動指導を取り入れる事によりその後自主的に運動を継続できるケースに時々遭遇するが，この動機付けに関わる要素に関する研究はほぼ皆無である。

グレリンは，1999年に児島ら²⁾によりラットおよびヒトの胃から発見された28個のアミノ酸からなるペプチドであり，その生理活性として強力な成長ホルモン (GH) 分泌促進作用を有するだけでなく，摂食促進作用，脂肪蓄積など代謝系に対する様々な作用がみられる。我々はグレリン・ノックアウト (GKO) マウスでは体温や血圧・心拍数の日内リズムに異常が認められ，交感・副

交感神経日内リズムの恒常性が破綻していることを報告している [平成 19～21, 22～24 年度基盤研究 (C)，課題番号 19590840, 22500361]。さらにこの GKO マウスにおいては野生型 (WT) に比べて，明期の自発活動量が増加しエネルギー消費量の日内リズムに乱れが生じている事を見出した (図 1)。従って，自発活動量や体内エネルギー代謝の日内リズムの恒常性に摂食促進ホルモンのグレリンが関与している可能性が考えられる。

本研究はグレリンの摂食・代謝リズムや自発運動量を制御するメカニズムおよび両者のクロストークにおけるグレリンの役割を明らかにすることを目的とする。

1. 方法

1. 1 実験動物・プロトコール

本研究は，「久留米大学における動物実験に関する指針」に従って計画を策定し実施した。実験

動物はSD系雄性ラット3週齢（日本クレア）を用いた。飼育条件は室温約24℃，12時間の明暗サイクル（7:00点灯，19:00消灯）とし，一般飼育ケージにて飼育した。7日間の予備飼育後，4週齢の時点でラットを5匹ずつ4群に群分けし，16週齢までの12週間以下の条件で飼育した。

① CD-S 群：コントロール食（10 kcal% fat, D12450B, EPS 益新）にて飼育。

② CD-Ex 群：コントロール食にて飼育。6週齢時から隔週，回転かご付エネルギー代謝測定用チャンバー（小動物用エネルギー代謝測定システム，アルコシステム，図2）に移して3日間自発運動を行わせた。



図2 回転かご付き自発運動・エネルギー代謝測定用飼育チャンバー

③ HFD-S 群：高脂肪食（60 kcal% fat, D12492, EPS 益新）にて飼育。

④ HFD-Ex 群：高脂肪食にて飼育。CD-Ex 群と同様に6週齢時から隔週3日間自発運動を行わせた。

1. 2 測定方法

体重は毎週測定し，明期および暗期それぞれの期間における摂餌量は8，12，16週後に測定した。2週間ごとに上記エネルギー代謝測定システムに

より，各群の活動リズムおよびエネルギー代謝を測定した。16週齢の時点で，実験動物用マイクロX線CT装置（R_mCT2, リガク）により体組成を測定し，その後イソフルラン吸入麻酔下にて大動脈穿刺により採血後，血漿，胃組織のサンプルを採取した。グレリン動態は既報³⁾に従い以下に示す方法で解析した。

①免疫染色：active ghrelin（N末）抗体を用い胃組織内のグレリン陽性細胞の検出（ABC法）

②血漿・胃組織中グレリン測定：active ghrelin（N末）をradioimmunoassayにて測定

③胃内グレリン産生能測定：胃底部組織内のGhrelin mRNA, ghrelin O-acyltransferase（GOAT）mRNAをRT-PCR法にて測定

1. 3 統計解析

JMP Pro version 11（SAS Institute）を用いて解析した。2群間の比較はStudent's t-testにより，4群間の比較はOne-way ANOVA with Tukey's HSD testにより検定した。危険率5%未満を有意とした。

2. 結果

2. 1 自発運動による体重と体脂肪の変化

図3に示す通り，いずれの群においても週齢とともに体重は増加傾向を示した。HFD-S群は16週齢において最も体重が重かったが，CD群においてもS群はEx群に比べて体重増加が著明であった。興味深い事に，HFDにおいても自発運動導入により，16週齢の時点ではCD-Ex群とほぼ同等の体重を示した。同様の傾向は16週齢の内臓脂肪にも認められ，運動群はCD, HFDともに各々の非運動群と比較して有意の低下を認めた。一方，皮下脂肪に関しては自発運動による有意の効果は認めなかった。

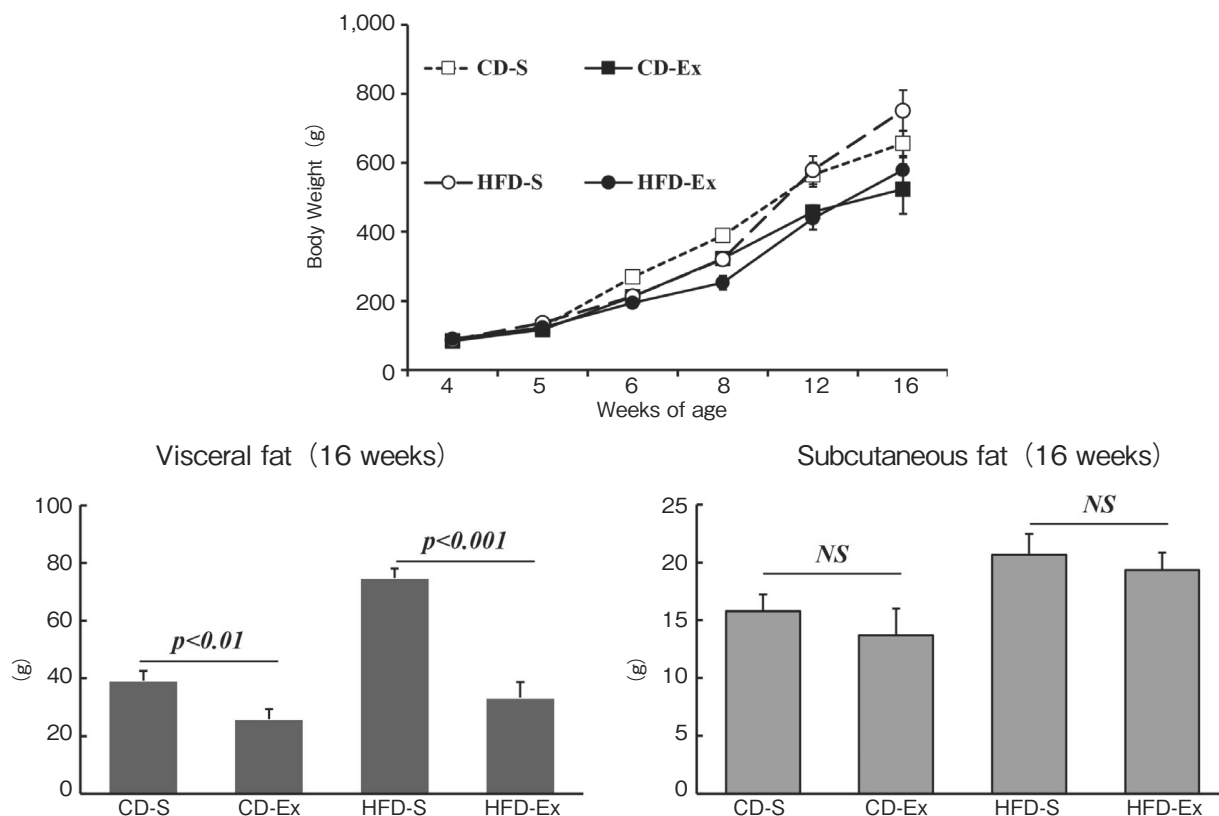


図3 体重と体脂肪の変化

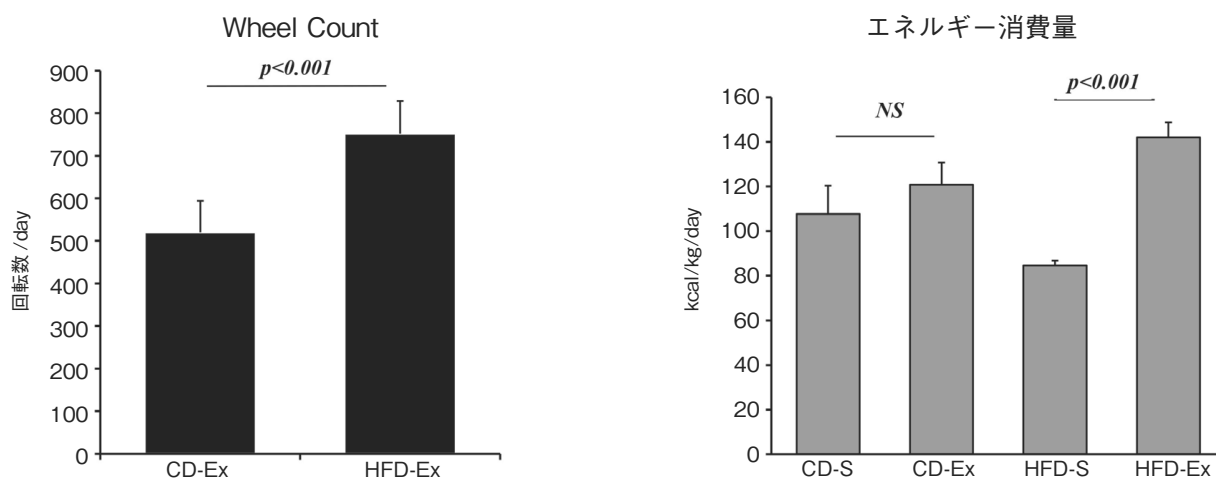


図4 16週齢における自発運動量（回転かご）とエネルギー消費量の変化

2. 2 自発活動量とエネルギー消費量の変化

運動群における回転かごの回転数は、HFD群がCD群に比較して有意に多かった。呼気ガス分析による一日のエネルギー消費量は、HFD群において自発運動により有意の増加を認めた(図4)。

2. 3 自発活動量の日内変動と摂餌パターンの変化

図5に示す通り、ラットはおもに暗期に著明な活動量の増加を示し、明期の活動量は極めて少ない(CD-S)。HFD-Sにおいては通常認められない明期の活動量の増加を認め、活動リズムの異

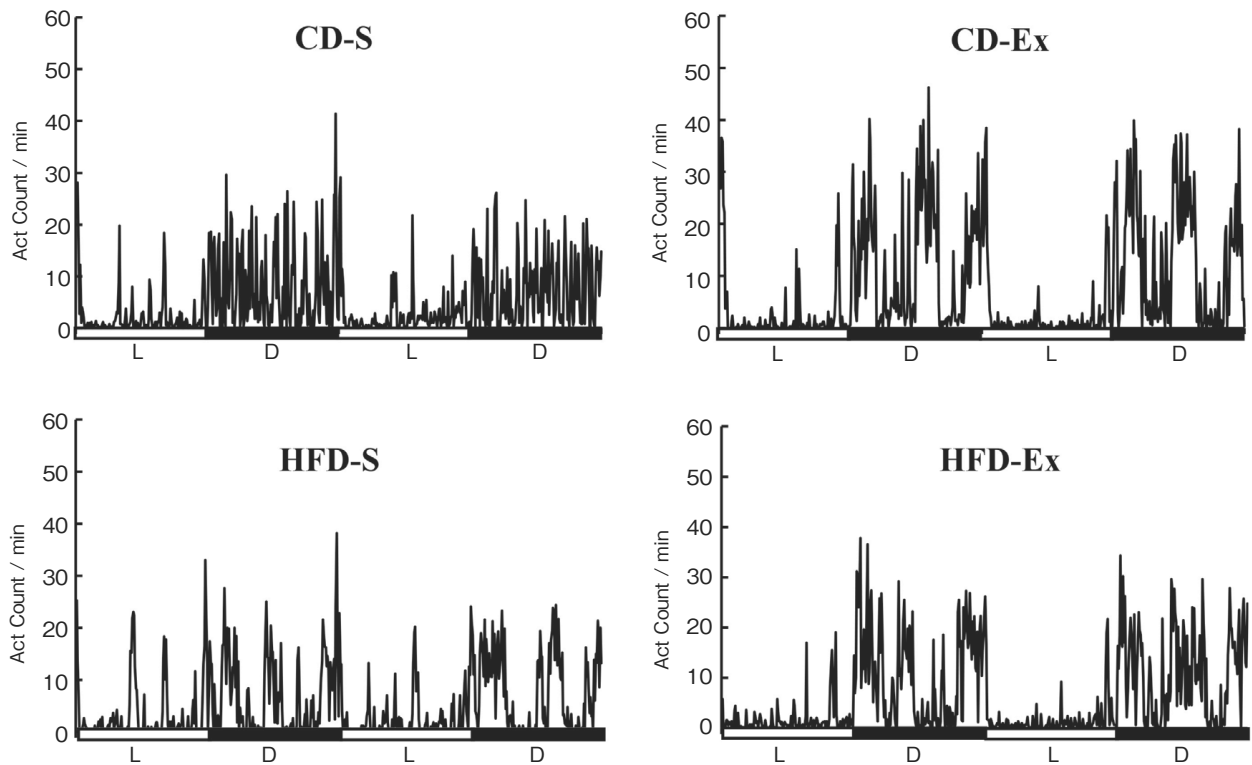


図5 16週齢における自発活動量の日内変動. L: 明期, D: 暗期

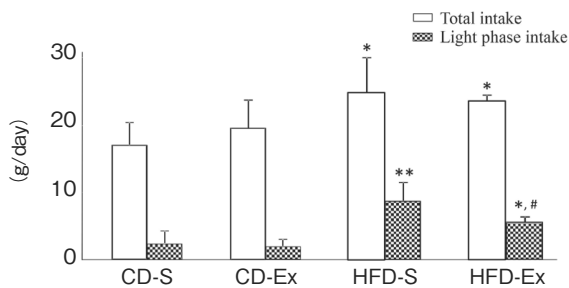


図6 16週齢における摂餌量およびパターンの変化
*P<0.05 vs CD-S. **P<0.001 vs CD-S. #P<0.05 vs HFD-S

常が示唆される。しかしながら、自発運動の導入により、このリズム異常はほぼ完全に正常化した(HFD-Ex)。

このリズム異常は摂餌パターンにも同様に認められ、HFD-S群においては一日の総摂餌量のみならず明期の摂餌量の割合が著明に増加しているが、自発運動の導入により部分的にはあるがその増加が抑制された(図6)。

2. 4 自発運動によるグレリン動態の変化

胃の免疫染色の結果、グレリン陽性細胞の数は

自発運動導入によりCDにおいても著明に増加を認めた。HFDによりグレリン陽性細胞は減少するものの、自発運動の導入により部分的に減少に歯止めがかかっていた(図7)。

血漿および胃内活性型グレリン濃度も、免疫染色の結果とほぼ一致していた。この傾向はグレリンおよびGOAT mRNAの結果ともほぼ一致していた(図8)。

3. 考 察

今回の研究により以下の結果が得られた。①2週間の内の3日間の自発運動の導入によりHFDによる体重や内臓脂肪量の増加を有意に抑制する事が可能であった。②HFD群では自発活動量がCD群に比べて多く、エネルギー消費量も著明な増加を認めた。③HFD群では、活動や食事のリズム異常を来しており、自発運動の導入によりこれらの異常が改善した。④HFD群ではグレリン産生が低下しているが、自発運動の導入により

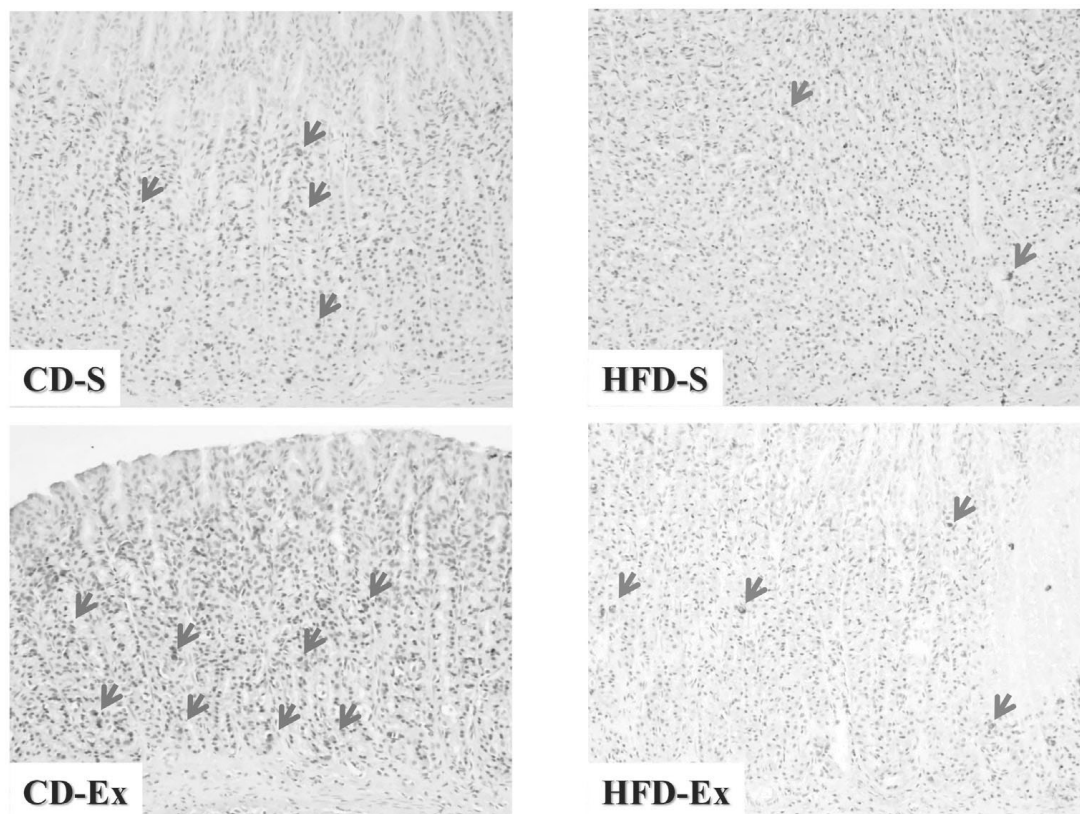


図7 16週齢における胃底部におけるグレリン陽性細胞の変化 (矢印)

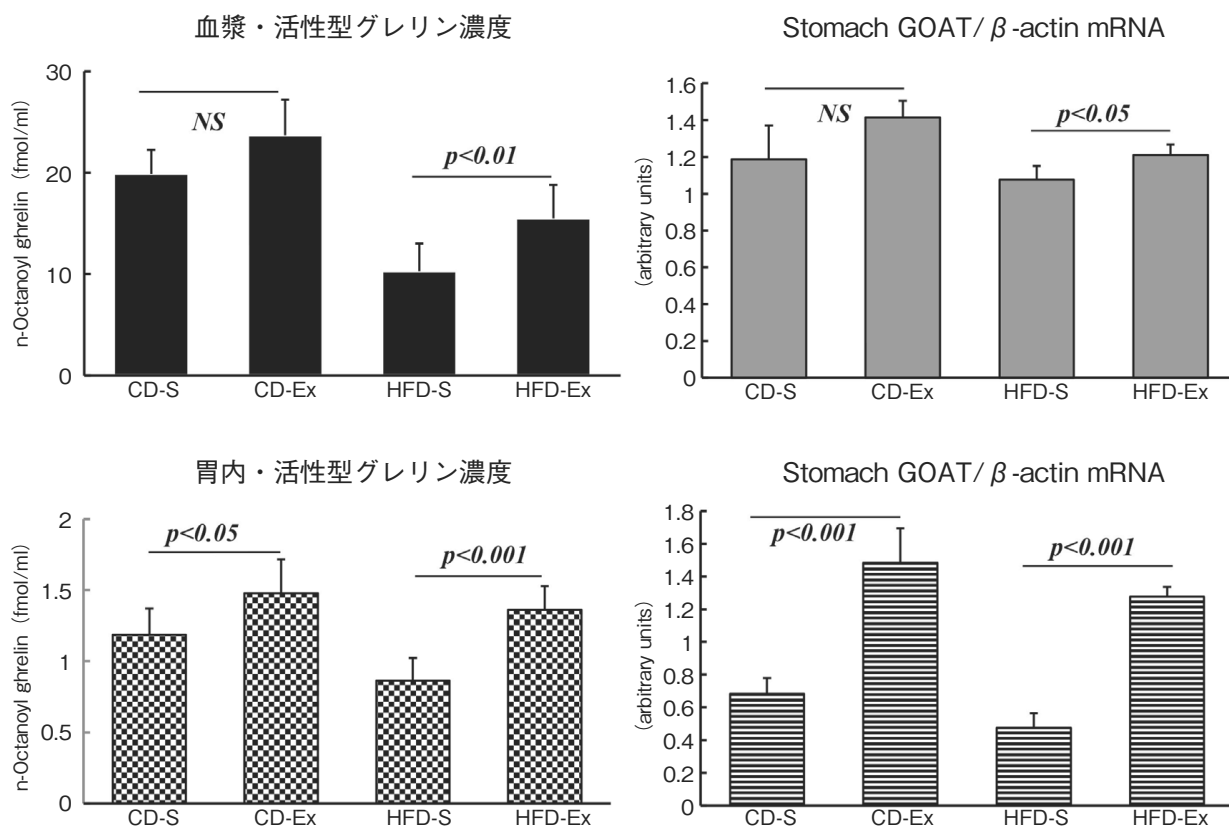


図8 16週齢におけるグレリン動態の変化

CD 群とほぼ同じレベルまで改善した。

HFD 群に運動を導入した場合、CD の運動群に比べて運動量やエネルギー消費量が著明に多く、内臓脂肪量も大きく減少した。すなわち、HFD 群において運動意欲がより大きく増加した可能性が考えられる。我々の GKO マウスにおける研究の結果、本 KO マウスでは探索行動（行動意欲）が WT マウスに比べ劣る事を集団行動解析装置による実験にて見出しており、グレリンと運動意欲との関連⁴⁾ が示唆される。HFD-Ex においてグレリン産生能の著明な増加が認められた事実は、間接的にはあるが、HFD-Ex 群における運動量増加におけるグレリンの関与に合致する結果である。

HFD 群では通常は認められない明期における活動の増加や摂餌量の増加を認めており、食リズムを始めとする生活リズムの乱れを示唆する所見であると考えられる。この現象はヒトの肥満における夜間摂食などの食リズム異常、いわゆる“むちゃ喰い障害 (binge eating)¹⁾ に近似した状態であり、肥満者の食リズム異常と運動の関連を研究するために非常に適したモデルであるといえる。興味深い事に、2週間に3日間の運動習慣の導入により、肥満状態でみられた生活リズムの乱れは完全に消失し、明期の摂餌行動もほぼ認めなくなった。従って、HFD-Ex 群において認められた体重や内臓脂肪減少の理由として、運動による単なるエネルギー消費量の増加以外に、上記の運動意欲増加と合わせて生活リズムの是正が大きく関与した可能性が考えられる。

HFD 肥満において血漿・胃内グレリン濃度およびグレリン産生能 (GOAT mRNA) は低下しており、自発運動によりこれらの指標は回復した。肥満時や高脂肪食負荷時にグレリンの機能が低下し⁵⁾、そのようなエネルギー代謝異常時にグレリンの摂食促進作用が抑制されているにも関わらず過食などの食行動異常が認められるメカニズム

に関してはいまだ不明の点も多い。最近我々は、GKO マウスでは明期の自発活動量が増加しエネルギー消費量の日内リズムに乱れが生じている事を見出しており (図 1)、今回の結果と合わせて肥満時のグレリン分泌異常が自発運動導入により是正され、その結果として運動意欲の向上や摂餌パターンの正常化を介して肥満の是正につながったと考える。しかしながら、運動によるグレリン正常化の機序や関連する molecule などは今回の研究では明らかにされておらず、今後の詳細な実験の結果が待たれる。

Preliminary data ではあるが、肥満者を対象とし ActiHR4® (CamNtech 社製) を用いて自律神経活動を評価した研究の結果、夜間睡眠中の副交感神経活動の上昇を認めない例が約半数存在し、肥満者における自律神経活動リズムの乱れが示唆された。今後これらの対象患者において、グレリンと自律神経活動のリズムの関連を詳細に調査するとともに、運動習慣の導入によるグレリンや自律神経活動リズムの変化を観察し、肥満の改善への関与を評価する予定である。

4. 結 論

肥満の形成には総エネルギー摂取量のみならず食リズムの是正が重要である。本研究の結果より、定期的な運動習慣が肥満者に多く認められる生活リズムの異常を是正し、同時に肥満を是正する可能性が考えられた。今後メタボリックシンドロームなどにおける生活習慣指導において、単なる食事・運動の内容に対する指導以外に時間栄養学的観点から新しい指導概念 (食事のタイミングや規則性、運動の時間帯への配慮など) を導入する事により、一層効果的な介入が可能となる事が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を

賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Marcus M.D., Wildes J.E., Disordered eating in obese individuals., *Curr. Opin. Psychiatry.*, **27**: 443-447 (2014)
- 2) Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach., *Nature.*, **402**: 656-60 (1999)
- 3) Mifune H., Nishi Y., Tajiri Y., Masuyama T., Hosoda H., Kangawa K., Kojima M., Increased production of active ghrelin is relevant to hyperphagia in nonobese spontaneously diabetic Torii rats., *Metabolism.*, **61**:491-495 (2012)
- 4) Menzies J.R., Skibicka K.P., Leng G., Dickson S.L., Ghrelin, Reward and Motivation., *Endocr. Dev.*, **25**:101-111 (2013)
- 5) Briggs D.I., Enriori P.J., Lemus M.B., Cowley M.A., Andrews Z.B., Diet-Induced Obesity Causes Ghrelin Resistance in Arcuate NPY/AgRP Neurons., *Endocrinology.*, **151**: 4745–4755 (2010)

正誤表

研究報告書著者からの申告により、正誤表を掲載いたします。

2021年12月2日

公益財団法人 石本記念デサントスポーツ科学振興財団

論文名) 運動意欲と食リズムのクロストーク: 摂食促進ホルモン・グレリンによる自発運動量制御機構の解明. デサントスポーツ科学 36: 177-185, 2015

筆頭著者の責任において、児島 将康氏を上記論文の共著者より削除することといたします。

2021年12月2日

田尻 祐司