

運動による脂肪組織の熱産生機能の向上に対する 免疫担当細胞の役割

千葉工業大学 川西 範明
(共同研究者) 順天堂大学 町田 修一
早稲田大学 鈴木 克彦

Role of Immune Cells in Improvement of Adipose Tissue Thermogenic Function by Exercise

by

Noriaki Kawanishi
*Sports Science Laboratory, Education Center,
Chiba Institute of Technology*
Shuichi Machida
*Graduate School of Health and Sports Science,
Juntendo University*
Katsuhiko Suzuki
Faculty of Sports Science, Waseda University

ABSTRACT

Exercise training is known to increase the thermogenic function of subcutaneous adipose tissue, but the mechanisms by which this may occur are incompletely understood. In this study, we aimed to examine the role of immune cells in promoting thermogenic function of adipose tissue by exercise training. C57/BL6J male mice were divided into normal diet plus sedentary group, high fat diet (HFD) plus sedentary group, high fat diet plus exercise training group. Mice in the exercise groups ran on a treadmill for 60 min/day, 5 day/week for 8 weeks. Mice fed the HFD had decreased

mRNA levels of UCP-1 and beige adipocyte marker of subcutaneous adipose tissue, but these mRNA levels were increased by exercise training. Mice fed the HFD had increased mRNA levels of macrophage marker and inflammatory cytokine, but these mRNA levels were decreased by exercise training. The results suggest that exercise training might increase thermogenic function of subcutaneous adipose tissue by suppressing infiltration of macrophages.

要 旨

運動トレーニングは皮下脂肪組織の熱産生機能を向上させる効果を有することが報告されているが、この現象の分子メカニズムについては不明である。本研究では、運動トレーニングによる脂肪組織の熱産生機能の向上に対する免疫担当細胞の役割を検討することを目的とした。C57/BL6J 雄マウス 18 匹を通常食餌 + 安静群、高脂肪食餌 + 安静群、高脂肪食餌 + 運動トレーニング群に群分けした。運動トレーニングは走行運動を 1 日 60 分間、週 5 回の頻度で 8 週間実施した。本研究の結果、高脂肪食餌負荷により減少する皮下脂肪組織の UCP-1 およびベージュ細胞マーカーの mRNA 発現は運動トレーニングにより増加が認められた。マクロファージマーカーと炎症性サイトカインの発現は高脂肪食餌負荷により増加が認められるが、これらの発現は運動トレーニングにより減少が認められた。以上のことから、運動トレーニングによる UCP1 発現の増強には、マクロファージの浸潤抑制を介した慢性炎症の減弱が関与している可能性がある。

緒 言

先進諸国では身体不活動や過栄養などの生活習慣の変化に伴い肥満患者が急増している。肥満は糖尿病や高血圧症、動脈硬化などの様々な合併症を併発し、その末期には生活の質を著しく低下させることから、肥満の予防あるいは改善の対策が

重要視されている。肥満症はエネルギー摂取とエネルギー消費のバランスの慢性的な破綻が発症基盤となることから、栄養を中心としたエネルギー摂取の減少と運動を中心としたエネルギー消費量の増大が治療法として有効と考えられている。運動は運動実施時に筋収縮などによりエネルギー消費を高めること以外に、運動トレーニングにより生じる骨格筋の肥大、ミトコンドリア容量や毛細血管密度の増大による代謝的適応により安静時のエネルギー消費量を増大させる効果を有する。近年、骨格筋同様に脂肪組織も安静時のエネルギー消費の増大に寄与することが明らかにされた。

肩甲骨周辺の褐色脂肪組織に局在する褐色脂肪細胞はミトコンドリアを多く含有しており、ミトコンドリアでの熱産生を介してエネルギー消費を高めることが知られている¹⁾。興味深いことに、皮下脂肪組織などの白色脂肪組織にもエネルギー消費を増大させる作用を持つベージュ脂肪細胞と呼ばれる脂肪細胞が存在することが知られている²⁾。重要なことに、褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞の活性と熱産生機能は加齢あるいは肥満に伴い低下する^{3,4)} ことから、代謝機能の亢進を目的としてベージュ脂肪細胞の機能向上を標的とした治療法の開発が重要視されている。

寒冷暴露は褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞の前駆細胞の増殖あるいは分化を誘導することで、これらの脂肪細胞の熱産生機能を高めることが知られている。重要なことに、ベージュ脂肪前駆細胞の増殖・分化あるいは熱産生機能は脂肪組織に局

在する様々な免疫担当細胞により制御されていることが近年解明されつつある。免疫担当細胞の一種であるマクロファージには生理機能が異なる2つのサブタイプが存在することが知られているが、寒冷暴露時には鼠径部周囲の皮下白色脂肪組織においては抗炎症性マクロファージの数が増加する。抗炎症性マクロファージが分泌する液性因子であるエピネフリンなどのホルモンやインターロイキン (Interleukin: IL) -4などのサイトカインの作用により、ベージュ脂肪前駆細胞の増殖や分化の亢進、熱産生の増大が惹起される^{5,6)}。一方で、加齢や肥満に伴い鼠径部周囲の皮下白色脂肪組織においては炎症性マクロファージなどの免疫担当細胞の数が増加するが、これらの免疫担当細胞は炎症性サイトカインなどの液性因子を分泌することによって、ベージュ脂肪前駆細胞の増殖が抑制される⁷⁾。したがって、脂肪組織に局在する各種の免疫担当細胞は熱産生機能の向上あるいは減弱に関与する。

運動トレーニングは寒冷暴露と同様に脂肪組織の熱産生機能を向上させる効果を有することが報告されている⁸⁾。実際に、運動トレーニングはマウスの皮下脂肪組織における熱産生機能の指標となる脱共役タンパク質 (Uncoupling Protein 1:UCP1) の発現を増強させる⁸⁾。しかしながら、運動トレーニングによる脂肪組織の熱産生機能向上の分子メカニズムについては不明な点が数多く残されている。

そこで、本研究では、運動トレーニングによる脂肪組織の熱産生機能の向上に対する免疫担当細胞の役割を検討することを目的とした。

1. 研究方法

1. 1 実験動物

11週齢のC57/BL6J雄マウス (n=18) を日本SLCから購入した。1週間の予備飼育後に、マウスは通常食餌+安静群 (ND+ Sed, n=6)、高脂

肪食餌+安静群 (HFD+Sed, n=6)、高脂肪食餌+運動トレーニング群 (HFD+ Ex, n=6) の3群に群分けした。なお、本実験は順天堂大学動物実験委員会の承認を得て行った。

1. 2 飼育条件

通常食餌摂取群には摂取カロリー換算で脂質13%を含む食餌 (D12450B: リサーチダイエツト社) を8週間自由摂取させた。高脂肪食餌摂取群には摂取カロリー換算で脂質60%を含む食餌 (D12492: リサーチダイエツト社) を8週間自由摂取させた。マウスは毎週に体重および摂食量の測定を行った。

1. 3 運動トレーニング

運動トレーニングは12週齢から20週齢までの8週間実施した。運動トレーニングは小動物用トレッドミル装置を用いて、1日60分間、週5回の頻度で実施した。運動強度は12.5m/minの速度、傾斜5%の条件で開始して、運動トレーニング期間で速度を徐々に増加させた。運動トレーニングの8週目の運動強度は20m/minの速度であった。尚、安静群のマウスはトレッドミル装置の側に60分間安静状態を保った。

1. 4 解剖および組織採取

20週齢のマウスは運動トレーニングの最終日から2日後にイソフルラン吸引麻酔下で安楽死後に、生理食塩水により環流脱血を行った。脱血後に、精巣周囲脂肪組織および鼠径部周囲脂肪組織を摘出して、組織重量を測定した。摘出した脂肪組織は液体窒素で凍結させた後、-80℃の冷凍庫にて保存した。

1. 5 Real-time quantitative PCR

鼠径部周囲脂肪組織のTotal RNAは、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) およびRNase-Free DNase

Set (QIAGEN) を用いて抽出した。その後 Nano Drop system (Nano Drop Technologies) を用いて RNA 濃度を測定した。Total RNA から、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems) を用いて、逆転写反応により cDNA を作製した。cDNA は Power UP SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて Fast real-time PCR 7300 装置 (Applied Biosystems) により定量した。PCR 条件は、95℃で 10 分間 cDNA を変性させた後に、1 サイクル 95℃で 15 秒間、60℃で 1 分間の条件で、40 サイクル繰り返した。構成的に発現する遺伝子として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を使用した。

1. 6 統計処理

結果は平均値 ± 標準誤差で表した。3 群間の比較は一元配置分散分析を行い、有意水準は 5% 未満とした。多重比較検定は Turkey's test を行い、有意水準は 5% 未満とした。

2. 研究結果

2. 1 高脂肪食餌および運動トレーニングによる皮下脂肪組織 UCP-1 遺伝子発現の変動

脂肪細胞に局在するミトコンドリアの内膜には UCP1 が発現しており、UCP1 の働きにより熱を産生することが知られている。したがって、UCP1 の発現は脂肪組織の熱産生機能を示す指標として用いられている。図 1 は各群のマウスの鼠径部周囲皮下脂肪組織における UCP1 mRNA 発現量を示したものである。皮下脂肪組織の UCP1 mRNA 発現は 8 週間の高脂肪食餌負荷によって有意に減少することが示された。しかしながら、高脂肪食餌負荷条件において安静群と比較して運動トレーニング群では UCP1 mRNA 発現は有意に高値を示した。

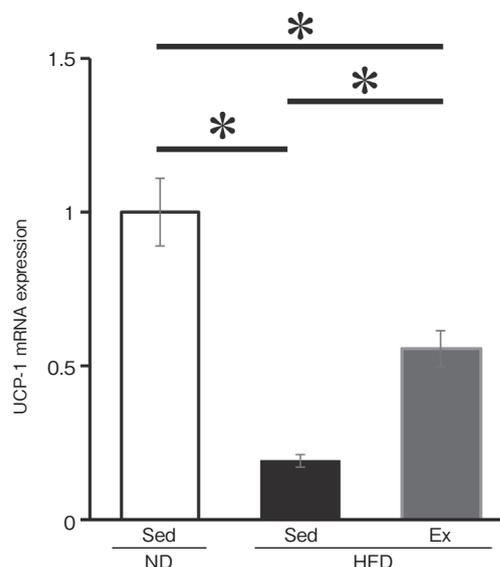


図 1 Effect of high fat diet and exercise training on UCP-1 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of mice. Values represent mean ± SEM. *P < 0.05

2. 2 高脂肪食餌および運動トレーニングによる皮下脂肪組織ベージュ脂肪細胞マーカー発現の変動

皮下脂肪組織には白色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞が局在しており、これらの細胞の増減によって熱産生機能が制御されている。白色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞はそれぞれ異なる前駆細胞から分化することが知られているが、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞で特異的に発現するマーカーが近年には同定されている。TMEM26 および CD137 はベージュ脂肪細胞の前駆細胞で強く発現していることから、これらの分子はベージュ脂肪細胞の前駆細胞の増殖の指標としてとして用いられている。図 2 は各群のマウスの鼠径部周囲皮下脂肪組織における TMEM26 および CD137 の mRNA 発現量を示したものである。皮下脂肪組織の TMEM26 および CD137 mRNA 発現は 8 週間の高脂肪食餌負荷によって有意に減少することが示された。しかしながら、高脂肪食餌負荷したマウスでは 8 週間の運動トレーニングによりベージュ脂肪細胞マーカーの mRNA 発現が有意に増加することが示された。

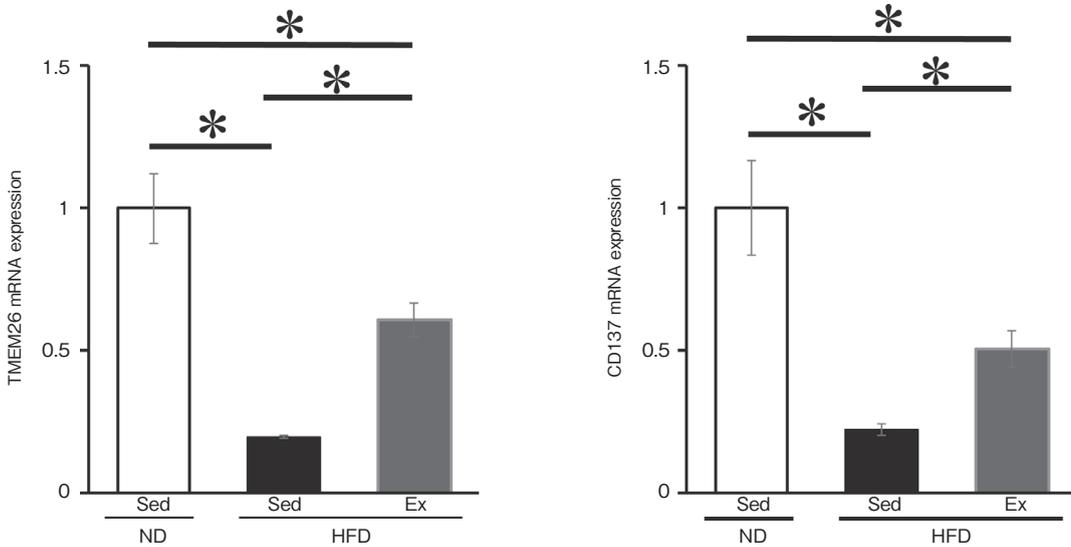


図2 Effect of high fat diet and exercise training on TMEM26 and CD137 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of mice
Values represent mean \pm SEM. *P < 0.05

2. 3 高脂肪食餌および運動トレーニングによる皮下脂肪組織マクロファージマーカー発現の変動

脂肪組織にはマクロファージが局在しており、炎症状態を正または負に制御することが知られている。F4/80 はマクロファージの細胞表面に発現しており、脂肪組織での F4/80 mRNA 発現量は

マクロファージの浸潤の指標として用いられている。また、マクロファージに炎症性マクロファージおよび抗炎症性マクロファージと異なるサブタイプが存在することが知られているが、炎症性マクロファージは CD11c を強発現することから、脂肪組織での CD11c mRNA 発現量は炎症性マクロファージ浸潤の指標として用いられている。図 3

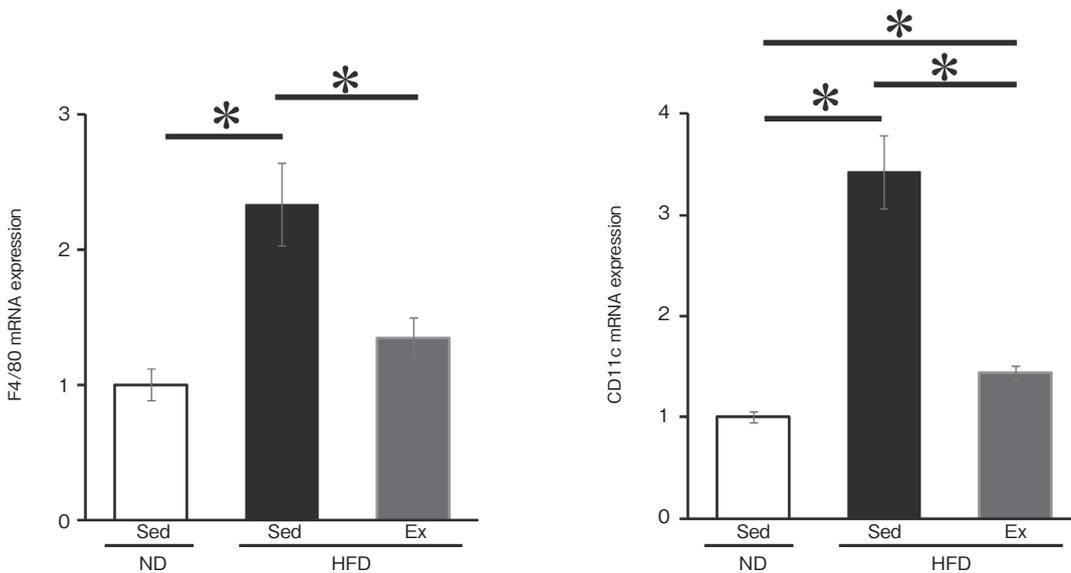


図3 Effect of high fat diet and exercise training on F4/80 and CD11c mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of mice
Values represent mean \pm SEM. *P < 0.05

は各群のマウスの鼠径部周囲皮下脂肪組織における F4/80 および CD11c の mRNA 発現量を示したものである。皮下脂肪組織の F4/80 および CD11c mRNA 発現は 8 週間の高脂肪食餌負荷によって有意に増加することが示された。しかしながら、高脂肪食餌負荷したマウスでは 8 週間の運動トレーニングにより F4/80 および CD11c mRNA 発現が有意に減少することが示された。

2. 4 高脂肪食餌および運動トレーニングによる皮下脂肪組織炎症性サイトカイン発現の変動

図 4 は各群のマウスの鼠径部周囲皮下脂肪組織における炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor (TNF) - α および IL-6 の mRNA 発現量を示したものである。TNF- α および IL-6 の mRNA 発現は通常食群と比較して高脂肪食群で有意に高値を示した。しかしながら、高脂肪食餌負荷条件においては安静群と比較して運動トレーニング群では TNF- α および IL-6 mRNA 発現は有意に低値を示した。

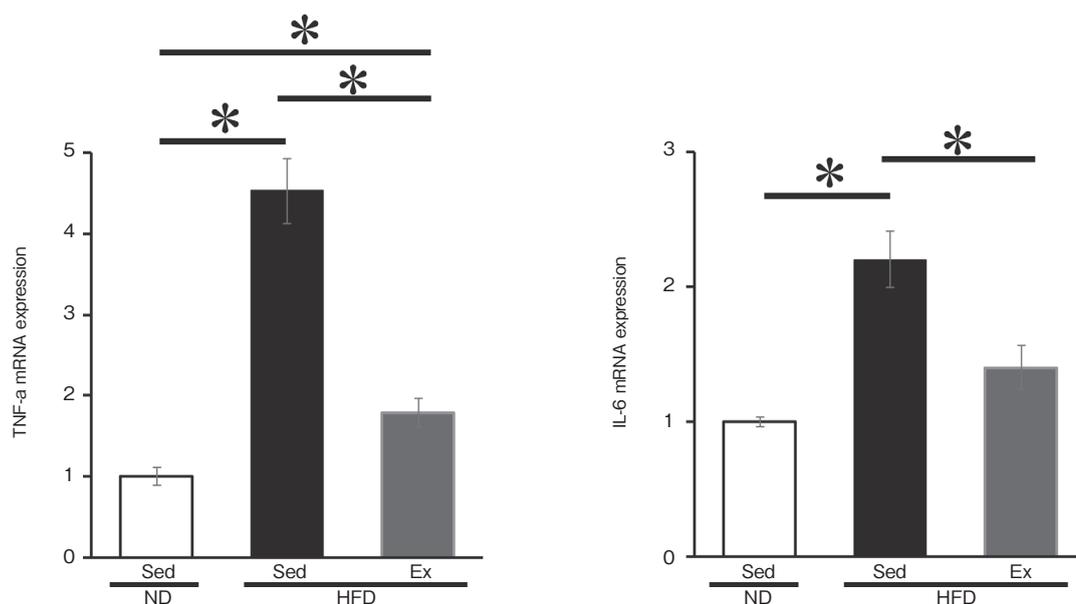


図 4 Effect of high fat diet and exercise training on TNF- α and IL-6 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of mice
Values represent mean \pm SEM. *P < 0.05

3. 考 察

本研究は、運動トレーニングによる脂肪組織の熱産生機能の向上に対する免疫担当細胞の役割を検討することを目的として実施した。

本研究の結果、高脂肪食餌負荷によって皮下脂肪組織の UCP1 発現が減少したことから、肥満によって脂肪組織での熱産生機能が低下することが認められた。皮下脂肪組織での熱産生はベージュ脂肪細胞が重要な役割を担っているが²⁾、高脂肪食餌負荷によりベージュ脂肪細胞の前駆細胞マーカーの発現が UCP-1 同様に高脂肪食餌負荷により減少したことから、肥満による熱産生機能の減弱にはベージュ脂肪細胞の減少が関与する可能性が考えられる。近年、運動トレーニングはマウス皮下脂肪組織での UCP1 発現を増加させることが報告されており、熱産生機能を向上させる効果を有することが知られている⁸⁾。興味深いことに、本研究により、高脂肪食餌負荷に伴う UCP1 およびベージュ脂肪細胞の前駆細胞マーカー発現の減少は運動トレーニングにより抑制されることが認

められた。これらの結果は、運動トレーニングはベージュ脂肪細胞を増殖させることで、肥満マウスの脂肪組織の熱産生機能を向上させる可能性を示唆している。

肥満や加齢に伴い皮下脂肪組織では炎症性マクロファージの浸潤増大などの免疫担当細胞の量的な変動を生じさせることが報告されている。さらに、抗炎症性マクロファージの減少など免疫担当細胞の質的な変動を生じさせる。このような肥満や加齢による免疫担当細胞の量的あるいは質的な変動は脂肪組織での過剰な慢性炎症を生じさせ、糖代謝機能障害を引き起こす。近年、皮下脂肪組織での慢性炎症は熱産生機能障害を誘導することが明らかにされているが、この現象には炎症性サイトカインによるベージュ脂肪前駆細胞の増殖や分化の抑制が関与する⁷⁾。我々は、これまでに肥満マウスを用いて検討により、内臓脂肪組織での炎症性マクロファージの浸潤と慢性炎症が運動トレーニングにより減弱することを報告してきた⁹⁾。本研究の結果、運動トレーニングにより高脂肪食餌負荷マウスの皮下脂肪組織における炎症性マクロファージおよび炎症性サイトカインの発現の低下が認められた。したがって、運動トレーニングは皮下脂肪組織においても炎症性マクロファージの浸潤を抑制することで慢性炎症を軽減させる効果を有する可能性が示唆された。このことから、運動トレーニングにより肥満マウスの熱産生機能を向上させるメカニズムとして、マクロファージの浸潤抑制を介した慢性炎症の減弱が関与することが推察される。

本研究の限界として、現時点ではベージュ脂肪細胞の増殖や免疫担当細胞の脂肪組織への浸潤の評価が遺伝子発現の測定のみであることが挙げられる。本研究で得られたベージュ脂肪細胞およびマクロファージのマーカー発現が運動トレーニングによって変化するという結果が、実際にベージュ脂肪細胞やマクロファージの脂肪組織での細

胞数の変動を示しているのかについては今後の検討課題である。今後は、シングルセルで各種の脂肪細胞や免疫担当細胞を同定することが可能となるフローサイトメトリー法および組織免疫化学染色法によって、細胞数および組織局在を評価する必要がある。また、炎症性マクロファージ以外にも脂肪組織の熱産生を制御する免疫担当細胞が存在することから、運動トレーニングによりどのような免疫担当細胞が皮下脂肪組織で変動するのかについて網羅的に評価することが必要である。さらに、免疫担当細胞の脂肪組織への浸潤阻害モデルを用いて、運動による脂肪組織の熱産生機能の向上に対する免疫担当細胞の役割を詳細に検証することが必要である。

4. 結 論

運動トレーニングを行うことによって、高脂肪食餌負荷マウスの皮下脂肪組織でのUCP1発現の増強が認められるが、その調節に関わるメカニズムとして、マクロファージの浸潤抑制を介した慢性炎症の減弱が関与している可能性がある。

謝 辞

本研究の遂行にご助成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心よりお礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多大なるご協力を賜りました順天堂大学横田睦美博士、後藤亜由美博士に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B.: Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 293(2), E444-52 (2007)
- 2) Wu J., Boström P., Sparks L.M., Ye L., Choi J.H., Giang A.H., Khandekar M., Virtanen K.A., Nuutila P., Schaart G., Huang K., Tu H., van Marken Lichtenbelt W.D., Hoeks J., Enerbäck S., Schrauwen P., Spiegelman B.M.: Beige adipocytes are a distinct

- type of thermogenic fat cell in mouse and human, *Cell*, **150**(2), 366-376 (2012)
- 3) Berry D.C., Jiang Y., Arpke R.W., Close E.L., Uchida A., Reading D., Berglund E.D., Kyba M., Graff J.M.: Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans, *Cell Metab.*, **25**(1), 166-181 (2017)
 - 4) Sakamoto T., Nitta T., Maruno K., Yeh Y.S., Kuwata H., Tomita K., Goto T., Takahashi N., Kawada T.: Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **310**(8), E676-E687 (2016)
 - 5) Nguyen K.D., Qiu Y., Cui X., Goh Y.P., Mwangi J., David T., Mukundan L., Brombacher F., Locksley R.M., Chawla A.: Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis, *Nature*, **480**(7375), 104-108 (2011)
 - 6) Qiu Y., Nguyen K.D., Odegaard J.I., Cui X., Tian X., Locksley R.M., Palmiter R.D., Chawla A.: Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat, *Cell*, **157**(6), 1292-1308 (2014)
 - 7) Chung K.J., Chatzigeorgiou A., Economopoulou M., Garcia-Martin R., Alexaki V.I., Mitroulis I., Nati M., Gebler J., Ziemssen T., Goelz S.E., Phieler J., Lim J.H., Karalis K.P., Papayannopoulou T., Blüher M., Hajishengallis G., Chavakis T.: A self-sustained loop of inflammation-driven inhibition of beige adipogenesis in obesity, *Nat. Immunol.*, **18**(6), 654-664 (2017)
 - 8) Stanford K.I., Middelbeek R.J., Goodyear L.J.: Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations, *Diabetes*, **64**(7), 2361-2368 (2015)
 - 9) Kawanishi N., Mizokami T., Yano H., Suzuki K.: Exercise attenuates M1 macrophages and CD8+ T cells in the adipose tissue of obese mice, *Med. Sci. Sports. Exerc.*, **45**(9), 1684-1693 (2013)