

脂肪細胞分化過程およびアディポサイトカイン分泌に 及ぼす運動頻度・持続期間の影響

共立薬科大学	木村真規
(共同研究者) 同	篠崎智一
同	細山田真
東京慈恵会医科大学	山内秀樹
同	鈴木政登

Effect of Frequency and Duration of Exercise on Cellularity of Adipocyte and Secretion of Adipocytokines

by

Masaki Kimura, Tomokazu Shinozaki, Makoto Hosoyamada
Kyoritsu University of Pharmacy
Masato Suzuki, Hideki Yamauchi
Jikei University, School of Medicine

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the optimal weight reduction program for dietary and exercise therapy. We tested about the rate of weight reduction arranged by voluntary wheel running protocol that will effect on the cellularity of adipocyte and secretion of adipocytokines.

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, an animal model of hyperphagia and obesity, was used in this study (n=12, 19-week-old at the end of experiment). The rats were randomly assigned to either the 2 (17 to 19-week-old, everyday) or 4 (15 to 19-week-old, about every two day) weeks voluntary exercise or control group. The exercise frequency and duration were arranged, and all rats weighed about 85% of control rats at the

end of experiment.

Compared to 2 weeks exercise, 4 weeks exercise promoted the downsizing of adipocyte and provided a weak reduction in the value of blood adiponectin concentration. These results suggested that the low frequency and long duration exercise therapy is more effective for the cellularity of adipocyte and maintenance of blood adiponectin concentration compared to the high frequency and short duration exercise therapy.

要 旨

本研究では、運動の頻度、持続期間の違いがアディポサイトカインの分泌に与える影響について考察するために、過食性肥満モデルOLETFラットを対象に、同一体重までの運動療法をその頻度と持続期間を調節することによって実施し、脂肪細胞の分化過程およびアディポサイトカイン分泌について検討を行った。

17週齢から2週間の自発走運動を実施した群(EX-2w)と、15週齢から4週間に渡って2日に1回程度の自発走運動を行った群(EX-4w)では、EX-2w群よりもEX-4w群で脂肪細胞サイズが小型化する傾向が観察され、それに伴って血中のアディポネクチン濃度はEX-2w群よりEX-4w群で有意な高値が観察された。

以上の結果から、運動療法では短い期間で急速に体重を減少させる運動プログラムよりも、目標体重までの介入期間をより長く設定し、ゆっくりと長期間に渡って運動を継続するプログラムにおいて、脂肪細胞サイズが小型化し、血中のアディポネクチン濃度を高値に維持できる可能性が示唆された。

緒 言

肥満を伴う高血糖、高脂血症および高血圧では、それぞれの症状は軽微であっても心血管イベントの発生率が急増することから、これらの病態（メタボリックシンドローム）の予防手段として肥満

の早期改善が重要視されている。近年、脂肪細胞からは様々な生理活性物質（アディポサイトカイン）が分泌されていることが明らかとなり、特に悪玉のTNF- α や善玉のアディポネクチンはメタボリックシンドロームの病態形成において主要な因子となっていることが解明されつつある¹³⁾。

肥満の予防法としては運動療法や食事療法が広く行われているが、我々は先行研究において、運動療法は食事療法と比較して腹部の皮下脂肪や内臓脂肪を特異的に減少させることを明らかにし、メタボリックシンドロームの予防手段として好ましい介入方法である可能性を報告した⁸⁾。しかし、運動療法後には血中のアディポネクチンが増加しないという報告が散見され、運動とアディポネクチンの発現・分泌との関係には不明な点が多く残されている^{2,7,10)}。最近の*in vitro*研究では、ストレス時に分泌されるグルココルチコイドによってアディポネクチンの血中濃度が低下する可能性が報告されており、ストレスに伴って血中グルココルチコイド濃度が増加する過度の運動療法では、血中アディポネクチンが増加し難い可能性が示唆される^{4-6,12)}。そこで本研究では、運動の頻度、持続期間の違いがアディポサイトカインの分泌に与える影響について考察するために、同一体重までの運動療法をその頻度と持続期間を調節することによって実施し、体脂肪量の減少速度を変えることによって、減量後の血中のグルココルチコイドと脂肪細胞の分化過程（脂肪細胞サイズの変化）およびアディポサイトカイン分泌について検討を

行った。

1. 研究方法

本研究では、過食性に肥満を呈する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット¹⁴⁾ (♂, 12匹) を対象に運動療法を実施し、介入後の同一体重において各種パラメーターの比較を行った。また同週齢の非肥満対照モデルの Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラット (♂, 4匹) の体重変化を観察し、19週齢時の LETO ラットの体重を運動療法群の目標体重に設定した。全てのラットは13週齢から個別ケージにて飼育し、飲水および摂餌は自由とした。また、血液や各種臓器のサンプリングは、全ての群において19週齢時に行った。

1. 1 自発走運動による運動療法

15週齢のラット (n=4) を対象に、運動量を制限しながらの4週間の自発走運動を実施した (EX-4w群)。運動量の調節は、回転かごへのアクセスを数居扉を用いて制限することによって実施し、概ね2日に1回、1昼夜の運動制限を行った。運動の制限はラットの体重変化をモニターし、19週齢時に目標体重へ到達するように適宜調節を行った。

また17週齢のラット (n=4) を対象に、2週間の自発走運動を実施した (EX-2w群)。EX-2w群のラットは運動開始時より常時数居扉を開けて回転かごへのアクセスを許可し、常に自発運動が可能な状態で飼育した。

1. 2 サンプリングおよび測定・評価

エーテル前処置後、ネンブタール (50mg/kg, i.p.) による全身麻酔を実施し、左総頸動脈からの全血採血を行った。採血後、生理食塩水 (約50mL) を左心室から灌流し、各種臓器の摘出を行った。採取した血液は遠心分離後、小分けにし

て-80℃にて凍結保存した。凍結した血液は後日、室温にて解凍し、血中のレプチン (ラットレプチン ELISA キット, 矢内原), アディポネクチン (ラット・マウスアディポネクチン ELISA キット, 大塚製薬), コルチコステロン (AssayMax Corticosterone ELISA Kit, ASSAYPRO), テストステロン (Testosterone Enzyme Immuno Assay Kit, Cayman Chemical), エストラジオール (Estradiol Enzyme Immuno Assay Kit, Cayman Chemical) 濃度の測定を行った。

腹部の脂肪 (副睪丸周囲脂肪, 後腹膜脂肪, 腸管膜脂肪, 大網周囲脂肪, 皮下脂肪) は、摘出後、速やかに秤量し、内臓脂肪重量 (= 副睪丸周囲脂肪重量 + 後腹膜脂肪重量 + 腸管膜脂肪重量 + 大網周囲脂肪重量) および腹部総脂肪重量 (= 内臓脂肪重量 + 皮下脂肪重量) を算出した。また後腹膜脂肪と皮下脂肪は、10% ホルマリン緩衝液に4℃で2日間浸漬し、パラフィン包埋を行った。後日、ミクロトームを用いて厚さ6 μ m の組織標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って脂肪細胞サイズを計測した。

1. 3 統計解析

本研究で得られた測定結果は、平均 $\pm$ SD (本文・表中) または平均 $\pm$ SE (図中) で表した。各パラメーターの平均値の比較には一元配置分散分析を行い、有意差が認められたものには各群間の比較としてLSD法を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

2. 結果

飼育期間中、対照 CON 群 (n=4) の体重は成長に伴った増加が観察され、19週齢時には 530 ± 39 g に達した (図1)。EX-2w 群の体重は自発走運動によって開始時 (17週齢) の体重 (489 ± 18 g) から有意に減少し、19週齢時には 453 ± 12 g に達した ($p < 0.01$)。また、EX-4w 群の運動開始時

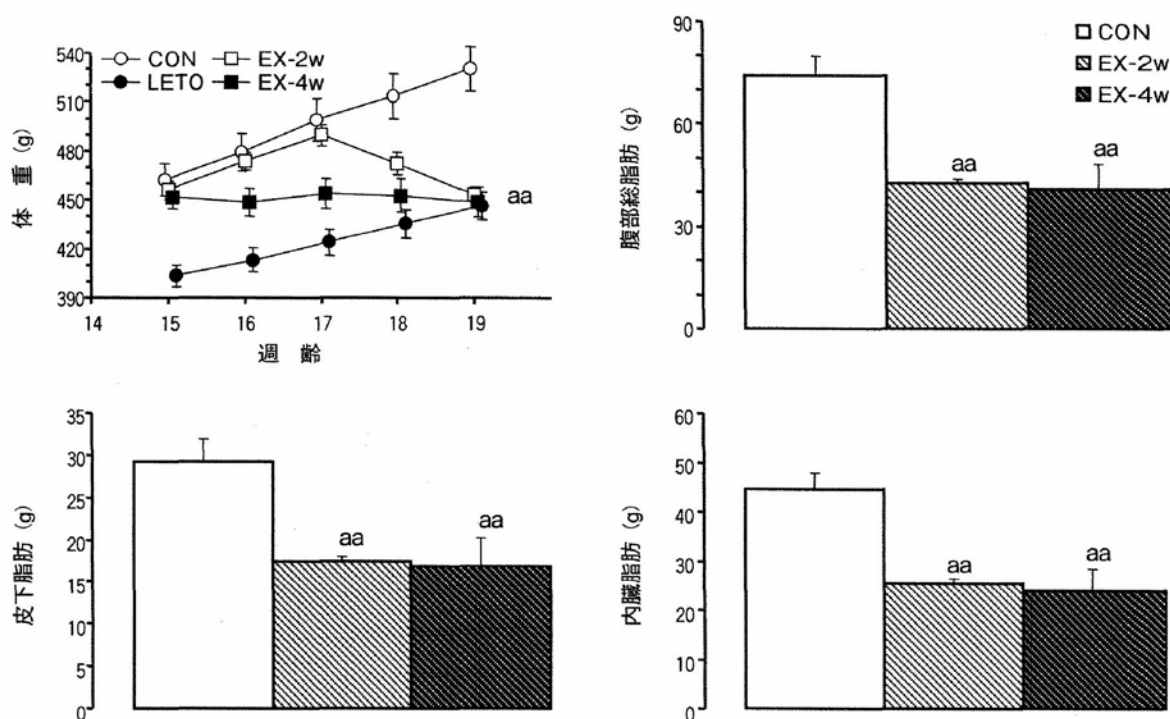


図1 体重および腹部脂肪重量の比較
Mean $\pm$ SE. aa: $p<0.01$ vs CON.

表1 各種脂肪組織重量の変化

	CON	EX-2w	EX-4w
後腹膜脂肪 (g)	20.6 $\pm$ 3.9	11.5 $\pm$ 0.9 aa	10.6 $\pm$ 4.1 aa
腸管膜脂肪 (g)	9.9 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 0.8 aa	5.3 $\pm$ 2.5 aa
大網周囲脂肪 (g)	1.9 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.8
副睾丸周囲脂肪 (g)	12.2 $\pm$ 2.4	7.7 $\pm$ 0.6 aa	6.8 $\pm$ 1.9 aa

Mean $\pm$ SD. aa: $p<0.01$ vs CON.

(15週齢)の体重は 451 ± 19 gであり、目標体重であるLETOラットの19週齢時の体重(446 ± 23 g)と大差が無かったことから、開始時の体重を維持するように運動量を調節し、2日に1回程度の自発走運動を行わせた(19週齢時のEX-4w群の体重は 449 ± 26 g)。

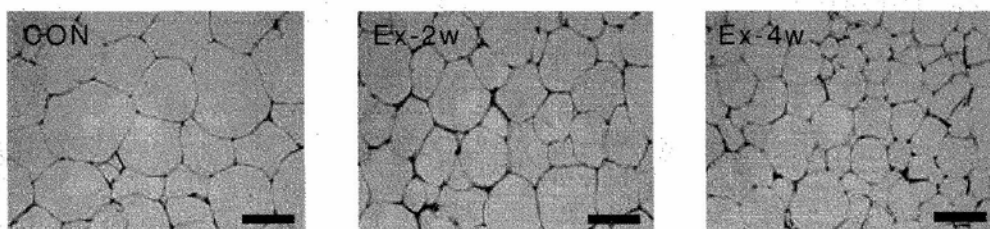
本研究の運動療法では、19週齢時のCON群の約85%までの体重減少に成功し、全ての群においてCON群との間に有意差が認められた(いずれも $p<0.01$, 図1)。

腹部脂肪重量は、運動療法によって顕著に減少し、EX-2w群およびEX-4w群ともCON群と比較して有意差が観察されたが(いずれも $p<0.01$)、運動療法群における介入期間の間に差は認められなかった(図1)。また、各部位の脂肪重量にも

同様の傾向が観察された(表1)。一方、後腹膜脂肪と皮下脂肪の組織標本における脂肪細胞サイズの比較では、運動療法によって脂肪細胞が小型化する傾向がみられ(図2)、更にEX-2w群よりもEX-4w群で脂肪細胞サイズのヒストグラムが左方へ変移する傾向が観察された(図3)。

血中のレプチン濃度は、運動療法によって顕著に低下し、両介入期間ともCON群との間に有意差が認められたが(いずれも $p<0.001$)、運動療法群における介入期間の違いに差はみられなかった(図4)。一方、血中のアディポネクチン濃度は両運動療法によって有意な低値が観察され(EX-2w群: $p<0.01$, EX-4w群: $p<0.05$)、介入期間の違いにおける比較ではEX-2w群よりもEX-4w群で有意な高値が観察された($p<0.05$)。

後腹膜脂肪



皮下脂肪

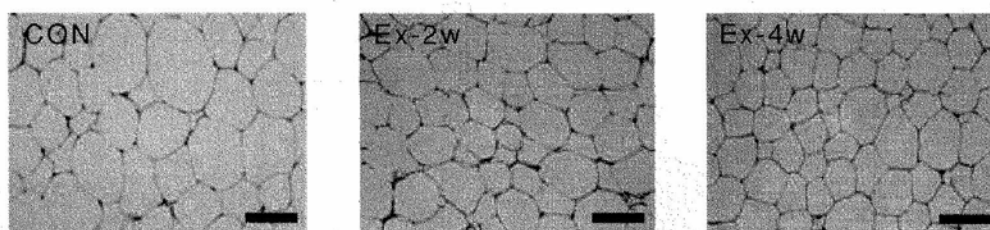


図2 脂肪組織の細胞形態像の比較 (図中のバーは50 μ m)

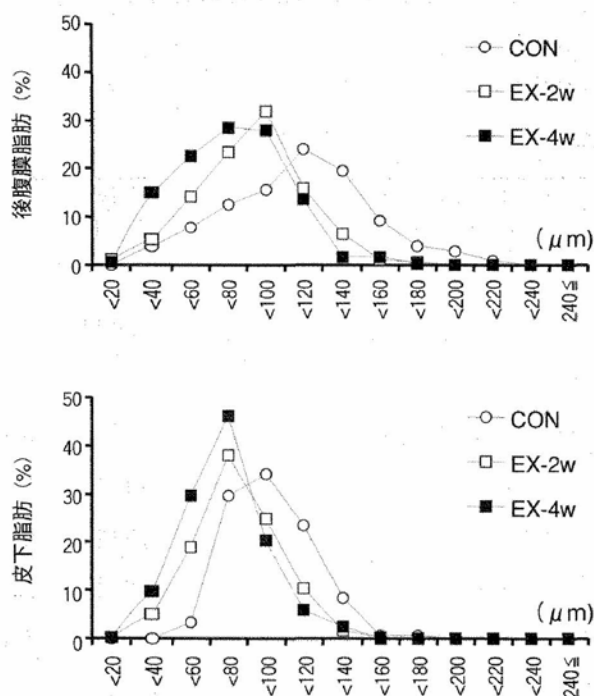


図3 脂肪細胞サイズ分布の比較

血中のコルチコステロン濃度は、運動療法によって高値となる傾向がみられ、CON群と比較してEX-4w群で有意差が認められた ($p<0.05$, 表2)。

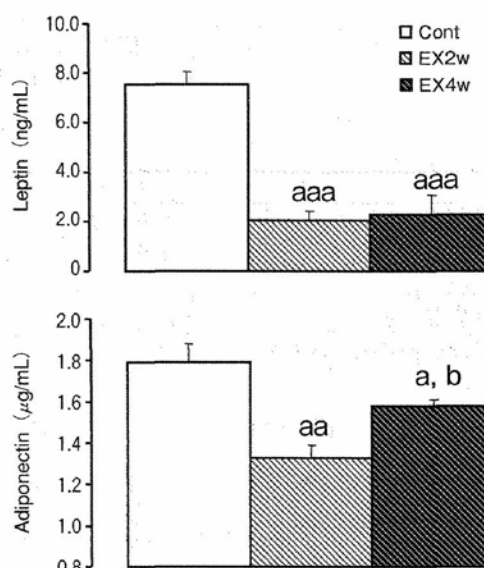


図4 血中レプチンおよびアディポネクチン濃度の比較

Mean $\pm$ SE. a: $p<0.05$, aa: $p<0.01$,
aaa: $p<0.001$ vs CON, b: $p<0.05$ vs EX-2w.

また血中のテストステロンおよびエストラジオール濃度は、運動療法によって高値となる傾向がみられたが、両運動療法群ともCON群との間に有意差は認められなかった。

表2 血中の各種ホルモン濃度の変化

	CON	EX-2w	EX-4w
コルチコステロン (μ g/mL)	1.08 $\pm$ 0.31	1.55 $\pm$ 0.99	1.82 $\pm$ 0.50 a
テストステロン (pg/mL)	359 $\pm$ 107	463 $\pm$ 42	423 $\pm$ 127
エストラジオール (pg/mL)	31.3 $\pm$ 2.5	33.8 $\pm$ 1.9	32.5 $\pm$ 2.8

Mean $\pm$ SD. a: $p<0.05$ vs CON.

3. 考 察

本研究では、運動の頻度、持続期間の違いが、アディポサイトカインの分泌に与える影響について考察するために、同一体重までの運動療法をその頻度と持続期間を調節することによって実施し、体脂肪の減少速度の違いによる減量後の血中グルココルチコイド濃度と脂肪細胞サイズの変化およびアディポサイトカインの分泌について観察を行った。

本研究では、運動療法の目標体重として19週齢時の非肥満対照モデルLETOラットの体重を用いた。19週齢時のLETOラットの体重は 446 ± 23 gであり、運動療法後の体重はEX-2w群： 453 ± 12 g、EX-4w群： 449 ± 26 gであり、両群ともほぼ目標体重に到達することが出来た（両群とも $p < 0.01$ vs CON群、図1）。また、大網周囲脂肪を除く各種の腹部脂肪重量は両運動療法によって顕著に減少し、CON群と比較して有意差がみられた（両群とも $p < 0.01$ vs. CON群、図1、表1）。しかし、運動期間（体重減少速度）の違いには、何れの脂肪重量にも差は認められなかった。我々が行った先行研究⁸⁾を除き、体重減少速度の違いにおける各種脂肪重量の比較を報告した研究は皆無である。本研究の結果は、我々の先行研究⁸⁾の結果を支持するものであり、同一体重までの2週間と4週間の運動療法では、各種の脂肪重量に差は生じないことが確認された。

しかし、本研究では更に運動療法に伴う脂肪細胞の分化過程について細胞のサイズ変化から検討を行ったところ、後腹膜脂肪および皮下脂肪の脂肪細胞のサイズは介入期間が2週間から4週間に延長することによって小型化する傾向が観察された（図2）。また、脂肪細胞サイズのヒストグラム解析の結果、その分布は左方へ変移する傾向がみられた（図3）。先行研究では、運動療法による体重減少に伴って脂肪細胞が小型化することが

報告されているが、介入期間の違いによる脂肪細胞サイズの変化についての報告は本研究が最初と思われる。

脂肪細胞が小型化する機序としては、①貯蔵エネルギーの減少による細胞サイズの縮小、②大型脂肪細胞のアポトーシスと前駆脂肪細胞の分化、③大型脂肪細胞の分裂、など様々な仮説が提唱されているが、その詳細には不明な点が残されている¹⁶⁾。本研究の結果では、運動療法期間の違いにおいて各種の脂肪重量に差は認められなかったことから、EX-2wよりもEX-4wで小型の脂肪細胞が多く観察された機序として、仮説①に加えて仮説②もしくは③が強く関与した可能性が考えられた。しかし本研究で得られたパラメーターからこれらの機序を解明することは困難であり、また本研究の結果には、体重の減少速度の違いばかりでなく、介入期間そのものの違いも影響していると考えられる。今後、2週間の急速な体重減少後にその体重を維持した場合などについて更なる検討が必要と思われる。

次に、介入期間の違いによる血中のレプチンおよびアディポネクチン濃度の変化について検討したところ、血中レプチン濃度は体重および体脂肪量の変化と同様に、両介入期間の運動療法ともCON群と比較して顕著な減少が観察された（両群とも $p < 0.001$ vs CON群）。また、血中アディポネクチン濃度は両介入期間の運動療法によって有意に減少したが（EX-2w群： $p < 0.01$ 、EX-4w群： $p < 0.05$ ）、4週間の運動療法では2週間の介入と比較して有意な高値が観察された（ $p < 0.05$ 、図4）。

レプチンは脂肪細胞から分泌され、血中レプチン濃度は体内の脂肪蓄積量を反映することから、本研究では運動療法による体重および体脂肪量の減少によって血中レプチン濃度の低下が観察された。一方、アディポネクチンは小型の脂肪細胞から多く分泌されるアディポサイトカインであり、

体重および体脂肪量の減少によって血中濃度が増加することが知られている。しかし、本研究の結果では、運動療法によって体重および体脂肪量が顕著に減少したにもかかわらず血中アディポネクチン濃度は増加せず、CON群と比較して有意な低値が観察された。

食事療法とは異なり、運動療法では血中アディポネクチン濃度は増加しないとする報告が散見される^{2, 7, 10)}。我々の先行研究では、同一体重までの12週間の食事療法と運動療法を行ったところ、血中のアディポネクチン濃度は対照群と比較して食事療法群で有意に増加し、運動療法群では不変であった⁹⁾。本研究では2週間の運動療法によって顕著に低下した血中アディポネクチン濃度が、4週間の運動療法においてゆっくりと体重を減少させたところ、有意に高い血中アディポネクチン濃度を観察することができた(図4)。以上の結果から、介入期間を延長し、長期間、ゆっくりと体重を減少させることによって、血中のアディポネクチン濃度を比較的高値に維持できる可能性が示唆された。

この機序について考察するために、血中アディポネクチン濃度に影響を及ぼす可能性の有る因子について観察したところ、血中アディポネクチン濃度と血中コルチコステロン($r = -0.49$)、テストステロン($r = -0.48$)、エストラジオール濃度($r = -0.57$)との間に比較的高い負の相関がみられ、血中エストラジオール濃度との間では有意な負の相関が認められた(図5)。グルココルチコイドは、*in vivo*および*in vitro*の先行研究におい

て、アディポネクチンの発現・分泌を抑制する可能性が報告されている^{4-6, 12)}。従って、本研究の運動療法において体重および体脂肪量が有意に減少したにもかかわらず血中のアディポネクチンが減少した機序として、運動療法に伴う血中コルチコステロン濃度の増加が影響した可能性が考えられた。しかし、血中コルチコステロン濃度が最も高値であったのはEX-4w群であり、血中アディポネクチン濃度との関係では疑問な点も残された。

また、同様にテストステロンも*in vivo*および*in vitro*の先行研究において、アディポネクチンの発現・分泌を抑制する因子である可能性が報告されている^{11, 15, 17)}。逆にエストラジオールは、血中のアディポネクチンを増加させる因子とする報告がみられ、血中のアディポネクチン濃度は、一般に男性よりも女性で高値を示すことが知られている^{1, 3)}。本研究においてこれらの内分泌因子が血中アディポネクチン濃度の変化にどの程度影響したかについて考察することは困難であったが、矛盾する生体応答も観察されたことから今後更なる検討が必要と思われた。また運動療法において血中のアディポネクチン濃度が増加しなかったとする報告では、用いた運動療法の種類や強度、期間などが一致しておらず、本研究よりも長期間の運動療法を行った先行研究においても血中アディポネクチンが減少した報告もみられることから、運動療法の介入期間について更に検討を進める必要性が感じられた。

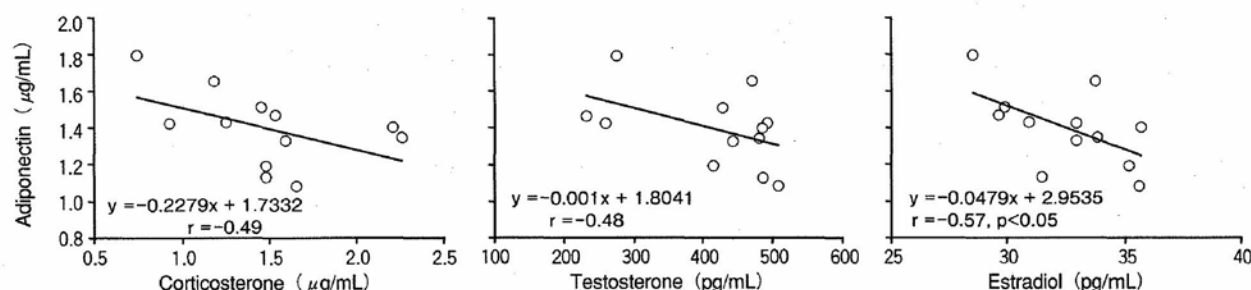


図5 血中の各種ホルモンとアディポネクチン濃度との関係

まとめ

本研究の結果から、運動療法では短い期間で急速に体重を減少させる運動プログラムよりも、目標体重までの介入期間をより長く設定し、ゆっくりと長期間に渡って運動を継続するプログラムにおいて、血中のアディポネクチン濃度を高値に維持できる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に多大なるご協力を頂きました町田美由紀氏に深謝致します。また、本研究にご尽力頂きました共立薬科大学薬物治療学講座の柴崎敏昭教授を始め諸氏に感謝致します。更に、本研究の実施にあたり OLETF ラットをご提供頂きました大塚製薬株式会社および本研究に対して助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Hotta K., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T., Matsuzawa Y., Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, Adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 257, 79-83 (1999)
- 2) Boudou P., Sobngwi E., Mauvais-Jarvis F., Vexiau P., Gautier J-F., Absence of exercise-induced variations in adiponectin levels despite decreased abdominal adiposity and improved insulin sensitivity in type 2 diabetic men. *European Journal of Endocrinology*. 149, 421-424 (2003)
- 3) Combs T.P., Berg A.H., Rajala M.W., Klebanov S., Iyengar P., Jimenez-Chillaron J.C., Patti M.E., Klein S.L., Weinstein R.S., Scherer P.E., Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*. 52, 268-276 (2003)
- 4) Fallo F., Scarda A., Sonino N., Paoletta A., Boscaro M., Pagano C., Federspil G., Vettor R., Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology*. 150, 339-344 (2004)
- 5) Fasshauer M., Klein J., Nermann S., Eszlinger M., Paschke R., Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290, 1084-1089 (2002)
- 6) Halleux C.M., Takahashi M., Delporte M.L., Detry R., Funahashi T., Matsuzawa Y., Brichard S.M., Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288, 1102-1107 (2001)
- 7) Hulver M.W., Zheng D., Tanner C.J., Houmard J.A., Kraus W.E., Slentz C.A., Kinha M.K., Pories W.J., MacDonald K.G., Dohm G.L., Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. *American Journal of Physiology*. 283, E861-E865 (2002)
- 8) 木村真規, 柴崎敏昭, 吉江文彦, 鈴木政登, 山内秀樹. 体脂肪減少速度とリバウンド現象の関係—中枢性摂食調節因子からの検討—. *デサントスポーツ科学*. 26, 137-144 (2005)
- 9) Kimra M., Shinozaki T., Tateishi N., Yoda E., Yamauchi H., Suzuki M., Hosoyamada M., Shibasaki T., Adiponectin is regulated differently by chronic exercise than by weight-matched food restriction in hyperphagic and obese OLETF rats. *Life Sciences*. 79, 2105-2111 (2006)
- 10) Kriketos A.D., Gan S.K., Poynten A.M., Furler S.M., Chisholm D.J., Campbell L.V., Exercise increases adiponectin levels and insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*. 27, 629-630 (2004)
- 11) Lanfranco F., Zitzmann M., Simoni M., Nieschlag E., Serum Adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy. *Clinical Endocrinology*. 60, 500-507 (2004)
- 12) Makimura H., Mizuno T.M., Bergen H., Mobbs C.V., Adiponectin is stimulated by adrenalectomy in ob/ob mice and is highly correlated with resistin mRNA. *American Journal of Physiology*. 283, E1266-E1271 (2002)

- 13) Matsuzawa Y., Funahashi T., Nakamura T., Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Annals of the New York Academy Sciences*. 892, 146-154 (1999)
- 14) Moran TH, Katz LF, Plata-Salaman CR, Schwartz GJ., Disorderd food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 274, R618-625 (1998)
- 15) Nishizawa H., Shimomura I., Kishida K., Maeda N., Kuriyama H., Nagaretani H., Matsuda M., Kondo H., Furuyama N., Kihara S., Nakamura T., Tochino Y., Funahashi T., Matsuzawa Y., Androgens decrease plasma Adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 51, 2734-2741 (2002)
- 16) 杉原甫, 戸田修二, 青木茂久, 船津丸貞幸. 脂肪細胞の増大と増殖. *Adiposcience*. 1, 21-27 (2004)
- 17) Xu A., Chan K.W., Hoo R.L.C., Wang Y., Tan K.C.B., Zhang J., Chen B., Lam M.C., Tse C., Cooper G.J.S., Lam K.S.L., Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 18073-18080 (2005)