

## 運動とアミノ酸の併用によるマイオカインを介した 褐色脂肪細胞化誘導と肥満予防を超える恩恵への発展

中 部 大 学 津 田 孝 範

### **Exercise Combined with Amino Acids Intake Induces Brown-like Adipocyte Formation and Obtains More Benefits Than Just Prevention of Obesity**

by

Takanori Tsuda

*College of Bioscience and Biotechnology and  
Graduate School of Bioscience and Biotechnology,  
Chubu University*

#### ABSTRACT

Exercise combined with food-derived factors may have significant effects on the suppression of body fat accumulation. Several trials suggested that amino acid mixtures containing alanine, arginine, and phenylalanine (AA-Mix) combined with exercise can significantly reduce abdominal fat in overweight adults and high-fat diet-induced obesity in mice. We therefore hypothesized that combining AA-Mix and exercise would significantly induce brown-like adipocyte formation, whereas either administration of AA-Mix or exercise alone would not. Administration of AA-Mix (1 g/kg) combined with exercise for 4 weeks significantly induced formation of brown-like adipocytes in inguinal white adipose tissue (iWAT) in mice, although AA-Mix or exercise alone did not. To clarify the mechanism that exercise combined with AA-Mix induces brown-like adipocyte formation, mice were loaded a single acute exercise for 1 h after a single administration of AA-Mix, then the expression of fibroblast growth factor 21 (FGF21) and interleukin-6 (IL-6) were examined. Plasma FGF21 concentration and

the mRNA levels in the liver and iWAT did not differ between the groups after 0 and 1 h of exercise. On the contrary, plasma IL-6 concentration was significantly increased in the exercise combined with AA-Mix group compared with the exercise alone group after 1 h of exercise. These results suggest that IL-6 is involved with exercise combined with AA-Mix induced brown-like adipocyte formation. These findings demonstrate the unique effect of exercise combined with AA-Mix for inducing beige adipocyte formation.

## 要 旨

運動と食品由来因子の併用は体脂肪蓄積抑制などの効果を高める可能性がある。これまでにアミノ酸の混合物（アラニン，アルギニン，フェニルアラニンの混合物；AA-Mix）の摂取と運動の併用はヒトやマウスで体脂肪量を低下させるとの報告があるが，この機構は不明である。著者はマウスにトレッドミルでの運動負荷とAA-Mix（1 g/kg体重）の投与を4週間実施すると，AA-Mix投与のみ，あるいは運動負荷のみでは褐色脂肪細胞化は誘導されないが，併用することで有意な誘導が認められることを見出した。この機構解明のために，AA-Mixを単回投与後に一過性の運動負荷を行い，その後運動終了直後と終了1時間後のfibroblast growth factor 21（FGF21）と interleukin-6（IL-6）の挙動を調べた。その結果，血漿FGF21濃度や肝臓および白色脂肪組織でのmRNAレベルには群間の差は認められなかったが，血漿IL-6濃度は併用群で運動負荷単独群と比較して運動終了後1時間で有意な上昇が認められた。従ってマイオカインの一つであるIL-6が併用による褐色脂肪細胞化誘導に関与している可能性がある。以上により運動と食品由来因子としてAA-Mixの併用が褐色脂肪細胞化の誘導というユニークな効果を示すことを明らかできた。

## 緒 言

「Exercise is Medicine」の言葉に象徴されるように，運動は多様な恩恵をもたらす。運動によるエネルギー代謝の亢進は，肥満をはじめとする疾患予防の重要なツールと考えられている。近年の研究から，運動により骨格筋からホルモン様の生理活性物質「マイオカイン」が分泌されることが，運動の効果をもたらす要因の一つではないか，とも考えられている。

「褐色脂肪細胞」は熱産生を行い，エネルギー消費を促進する。これまでの研究から寒冷刺激などで白色脂肪組織中に「誘導型」褐色脂肪細胞が分化誘導され，体脂肪が減少することが明らかになっている<sup>1)</sup>。しかし持続的な寒冷刺激は現実的ではない。従って実用的な方策としては，白色脂肪組織中で褐色脂肪細胞化を誘導する（褐色脂肪細胞を増やす）食品由来因子とその機序を解明し，これを活用させることである。

運動が白色脂肪組織（WAT）において「褐色脂肪細胞化」を誘導すること（ベージュ化）が，げっ歯類に加えてヒトでも報告されている<sup>2,3)</sup>。さらに褐色脂肪細胞化を誘導するマイオカインとしては，fibroblast growth factor 21（FGF21）や interleukin-6（IL-6）などが明らかになっている<sup>4,5)</sup>。一方著者らの研究グループは，これまでに食品由来因子による褐色脂肪細胞化誘導とその作用機構を複数報告している<sup>6,7)</sup>。運動による褐色脂

肪細胞化誘導は、あるレベル以上の運動強度が必要になると考えられるが、低～中強度でも特定の食品を併用すれば「褐色脂肪細胞化」が効果的に誘導され、運動と食品の併用によるベネフィットを明らかにできるのではないかと考えられる。運動との併用に効果的な食品由来因子については、運動とアミノ酸混合物摂取による体脂肪蓄積抑制作用の研究がある。これまでの研究では、アミノ酸の中で特にアラニン、アルギニン、フェニルアラニンの3種類のアミノ酸の混合物 (AA-Mix) の摂取と運動の併用は、脂質代謝の亢進や腹部脂肪量を低下させることが報告されている<sup>8, 9)</sup>。しかしこの作用機序については不明である。以上の背景から運動とAA-Mixの併用は体脂肪蓄積の抑制に有効であり、この作用機序の一つとして白色脂肪組織での褐色脂肪細胞化誘導が関わっているのではないかと、さらに運動と食品の併用による褐色脂肪細胞化誘導は、体脂肪蓄積抑制以外にも何らかの恩恵が得られる可能もあるのではないかと考えられた。以上の背景に基づく本研究の目的は、運動とAA-Mixの併用による白色脂肪組織中での「褐色脂肪細胞化」誘導の促進作用とその機序を明らかにすることである。

## 1. 実験方法

### 1. 1 実験動物

実験動物としてはC57BL/6Jマウス(雄, 4週齢)を用いた。マウスは納品後、予備飼育を行い、飼育環境に順化させた。予備飼育終了後、マウスを群分けし、以下の実験を行った。なお餌はAIN-93を基本にした標準精製飼料を用いた。本動物実験は中部大学動物実験委員会にて審査、承認を得て、動物の飼育、保管、苦痛の軽減、科学上の利用に関する配慮のもとで行った。AA-Mixは協和発酵バイオ株式会社製のL-アラニン、L-アルギニン、L-フェニルアラニンをそれぞれ25%、25%、50%の割合で混合したものである<sup>8)</sup>。

### 1. 2 AA-Mixの単独投与による褐色脂肪細胞化誘導の検証

予備飼育終了後のマウスを2群に分け(各群10匹)、コントロール群あるいはAA-Mix投与群を設定し、AA-Mix投与群にはAA-Mixを生理食塩水に溶解した溶液を4週間毎日経口投与(1 g/kg体重)した。飼料はAIN-93G精製飼料を自由摂取させた。飼育終了後、マウスより鼠径部白色脂肪組織(iWAT)、精巣上体白色脂肪組織(eWAT)および肩甲骨間の褐色脂肪組織(BAT)を採取した。得られた脂肪組織の一部はホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成し、その切片をhematoxylin & eosin (H & E)染色し、残りはタンパク質を抽出しウエスタンブロッティングによりuncoupling protein 1 (UCP1)およびローディングコントロールとして $\beta$ -Actinのタンパク質発現レベルを測定し、UCP1の発現レベルを $\beta$ -Actinの発現レベルで補正して定量値とした。

### 1. 3 運動とAA-Mix投与の併用による褐色脂肪細胞化誘導の検証

予備飼育終了後のマウスを2群に分け(各群10匹)、運動群(EX群)とAA-Mixを投与後に運動する群(EX + AA-Mix群)を設定した。AA-Mixの投与は1. 2と同様に行った。運動負荷はトレッドミル装置を用いて15 m/minから走行スピードを徐々に上げて最後の週は20m/minとし、1回当たり60分間の運動負荷を1週間に5日間行った。実験期間は4週間とした。なお、マウスの運動負荷条件はトレッドミル装置を用いてあらかじめ予備実験を実施し、運動負荷のみでは褐色脂肪細胞化が誘導されない条件で設定し実施した。実験終了後マウスよりiWAT、eWATおよびBATを採取した。採取した脂肪組織は1. 2と同様に解析・評価した。

1. 4 AA-Mixの単回投与後の一過性走行時の FGF21 およびIL-6の変化

予備飼育終了後のマウスを2群に分け、運動群 (EX群) とAA-Mixを投与後に運動する群 (EX-AA-Mix群) を設定した。試験当日にAA-Mixを経口投与 (1 g/kg 体重) した30分後、マウスに一過性の運動負荷 (20 m/min, 1時間) を行った。運動負荷終了直後、終了1時間後にマウスより採血し血漿を分離し保存した。さらにiWAT、肝臓と骨格筋 (主に腓腹筋とヒラメ筋を含む部位と主に前脛骨筋と長趾伸筋を含む部位) を採取した。血漿のFGF21およびIL-6濃度は市販のELISAキットを用いて測定した。さらにiWAT、肝臓、骨格筋のFGF21およびIL-6のmRNAレベルを測定した。

2. 結果および考察

2. 1 AA-Mixの単回投与による褐色脂肪細胞化誘導の観察

飼育終了時の体重、実験期間中の総摂餌量、解剖時の各脂肪組織重量は群間で有意な差は認められなかった。コントロール群とAA-Mix群のiWATおよびBATの代表的なH&E染色画像を図1に示す。iWATにおいてAA-Mix群はコントロール群と比較して褐色脂肪細胞化に明確かつ特徴的な多房化形成の所見は認められず、eWATでも同様であった。BATでは群間に差は認められなかった。

次にUCP1タンパク質発現量を図2に示す。

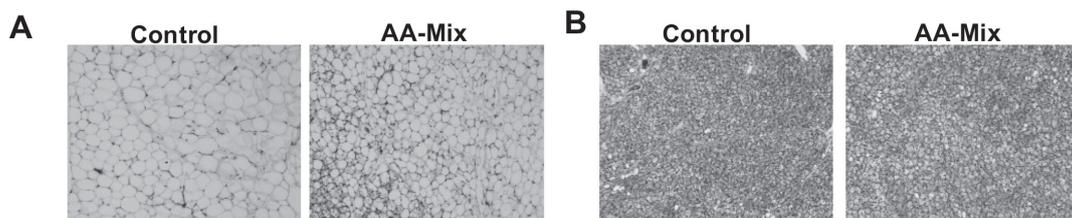


図1 コントロールおよびAA-Mix投与群のiWAT (A) およびBAT (B) の代表的なH&E染色像

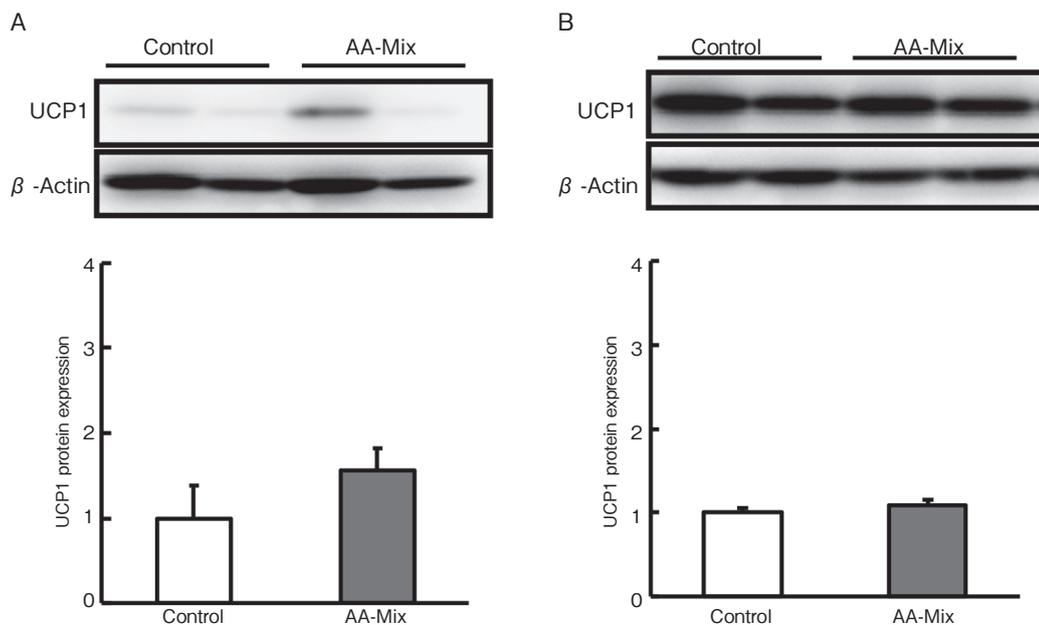


図2 コントロールおよびAA-Mix投与群のiWAT (A) およびBAT (B) のUCP1タンパク質発現量

AA-Mixの投与はiWATにおいて褐色脂肪細胞の指標であるUCP1のタンパク質発現を有意に誘導せず、さらにBATにおいても群間に有意な差は認められなかった。従って運動負荷がない状態では、AA-Mixのみを投与しても褐色脂肪細胞化の誘導に影響を与えないものと考えられた。

## 2. 2 運動とAA-Mix投与の併用による褐色脂肪細胞化誘導の検証

実験期間中の総摂取量、体重および脂肪組織重量には群間で有意な差は認められなかった。EX群とEX + AA-Mix群のiWATおよびBATのH&E染色の結果を図3に示す。EX + AA-Mix群では、iWATにおいてEX群と比較して褐色脂肪細胞化を示す多房化形成が顕著であった。一方BATは、

UCP1を恒常的に発現している組織であるが、両群の間に差は認められなかった。eWATではいずれの群でも褐色脂肪細胞化を示す所見は認められなかった。

iWATおよびBATのUCP1タンパク質発現量を図4に示す。iWATにおいては、EX + AA-Mix群はEX群と比較して褐色脂肪細胞化の指標であるUCP1タンパク質レベルは有意に上昇した。一方、BATにおいては両群の間に有意な差は認められなかった。以上の結果からAA-Mixを単独で摂取しても、褐色脂肪細胞化は誘導されないが、AA-Mixを摂取した後、運動を行うことで褐色脂肪細胞化を誘導できることが明らかになった。

この結果は褐色脂肪細胞化について、アミノ酸摂取と運動の併用が誘導の増幅を引き起こす新し

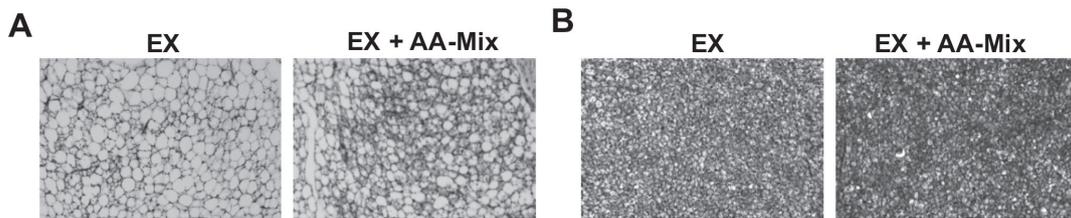


図3 EX群およびEX + AA-Mix群のiWAT (A) およびBAT (B) の代表的なH&E染色像

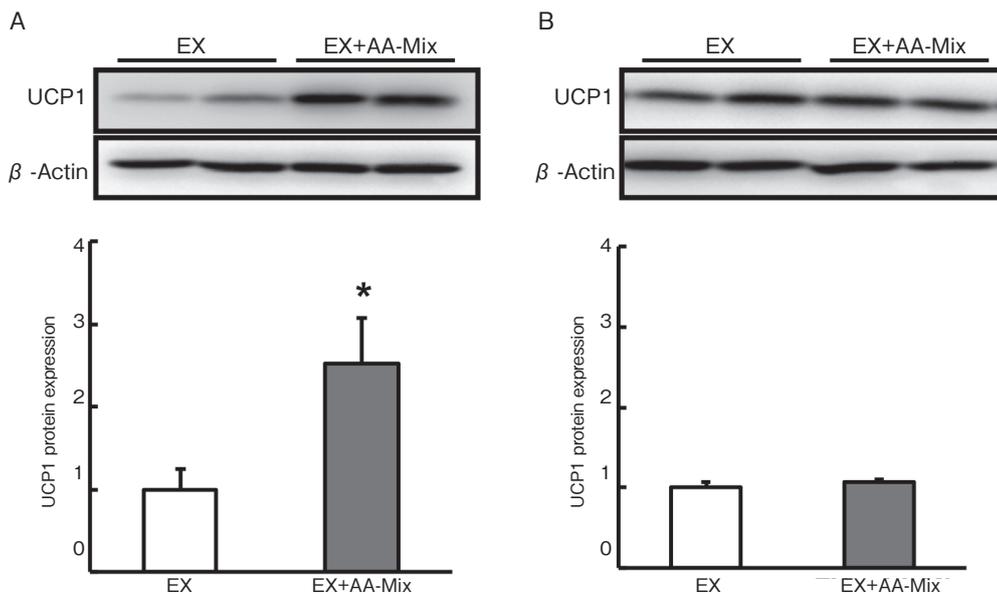


図4 EX群およびEX + AA-Mix群のiWAT (A) およびBAT (B) のUCP1タンパク質発現量  
\*: 群間で有意差 ( $p < 0.05$ ) あり

い事例の一つとして位置づけられる。すでに述べたように、ヒトあるいはマウスにおいてAA-Mixの摂取と運動の併用は、腹部脂肪量の低下や脂質代謝を亢進させることが報告されている<sup>8,9)</sup>。なお、本研究では脂肪組織重量に群間の差は認められなかったが、これは肥満モデルマウスや食事誘導性肥満モデルマウスを用いていない正常マウスでの普通食摂取時の結果であるため、その結果は矛盾しているとは考えられない。以上の結果、AA-Mixの摂取と運動の併用による既報での体脂肪蓄積抑制効果<sup>7,8)</sup>は、褐色脂肪細胞化の誘導が関与している可能性がある。

### 2. 3 AA-Mixの単回投与後の一過性走行時のFGF21およびIL-6の変化

運動とAA-Mixの併用による褐色脂肪細胞化の誘導の機構として想定できるのは、併用により何らかのマイオカインの発現・分泌が亢進し、WATに作用した結果、褐色脂肪細胞化が誘導されるのではないかと、ということである。例えばFGF21は、主要な発現部位は肝臓であるが、WATでも発現しており、褐色脂肪細胞化を誘導し<sup>4)</sup>、運動により血漿濃度が上昇することが報告されている<sup>10)</sup>。IL-6は同様に褐色脂肪細胞化を誘導する因子で、運動により上昇するマイオカインとして知られている<sup>5)</sup>。さらに $\beta$ -Aminoisobutyric acid<sup>11)</sup>や、meteorin-like<sup>12)</sup>なども運動による褐色脂肪細胞化誘導に関わる因子としての報告がある。従って運動とAA-Mixの併用による褐色脂肪細胞化の誘導に、これらのマイオカインの増加が関わっているのではないかと考えた。このうち本研究では、比較的よく知られているFGF21とIL-6の発現・分泌の関与を検討した。しかしながら、これまで実施してきた4週間の投与と運動負荷後の試料では、これらの分子の変化は長期にわたり変動が持続しないために観察することが困難である。従ってこれらのマイオカインの変動の有無を観察する

ためにAA-Mixを単回投与後に一過性の運動負荷を実施して、その挙動を調べた。

血漿FGF21濃度は運動終了直後(0h)、1h後のいずれも群間で有意な差は認められず、肝臓とiWATのFGF21 mRNAレベルも同様に群間での差はいずれの時間でも認められなかった。

一方血漿IL-6濃度は、運動終了直後(0h)では群間に有意な差は認められなかった。しかし運動負荷後1hでは、EX群と比較してEX+AA-Mix群で有意に上昇した(図5)。なおIL-6 mRNAレベルは、採取したいずれの骨格筋部位でも運動終了直後(0h)では群間に有意差は認められず、1hでは、いずれの骨格筋部位でもEX-AA-Mix群で上昇傾向が認められるものの、群間に有意な差は観察されなかった。

本研究でとりあげたFGF21とIL-6は、前述のようにいずれも運動によりその発現・分泌が上昇し、褐色脂肪細胞化を誘導する分子として知られている。本研究結果から、単回のARF経口投与後の一過性運動負荷は、FGF21の遺伝子発現量や血漿FGF21濃度には影響を与えないが、運動負荷後1hでは、併用群で血漿IL-6濃度が有意に上昇することがわかった。血漿IL-6濃度は運動後に急速に上昇するとともに、その後は速やかに低下する。本研究結果を踏まえると、4週間の運動とAA-Mix投与の併用においてIL-6の変化がどの程度褐色脂肪細胞化の誘導に関わっているのか、さらにIL-6やFGF21以外のマイオカイン分子の変化とその関与の解明、などの課題がある。褐色脂肪細胞化誘導が認められた4週間の運動とAA-Mix投与の併用実験では、一過性の運動負荷による影響を除くため、解剖前の最後の運動負荷から約1日後に血液や組織を採取している。この場合はFGF21やIL-6の血漿濃度の群間の変化は観察されない。今後は、IL-6の関与を検証するためにIL-6ノックアウトマウスでの解析等が必要になる。運動負荷後1hでは、併用群で血漿IL-6濃度の有意な上昇

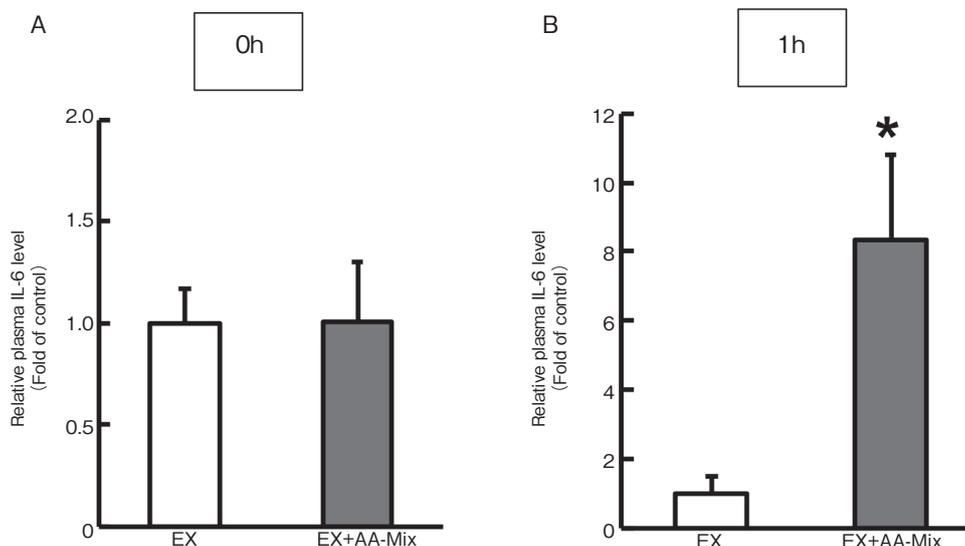


図5 一過性走行後（走行終了後0 hおよび1 h）のEX群およびEX + AA-Mix群の血漿IL-6濃度  
\*；群間で有意差（ $p < 0.05$ ）あり

は観察されるが、骨格筋組織でのmRNAレベルは、上昇傾向は認められるものの、有意な遺伝子発現量の上昇を伴わなかった。この理由は不明であるが、併用時の短時間の変化ではIL-6の分泌放出が主に行われているのかもしれない。

### 3. 総括

運動の効果を高める食品由来因子としてAA-Mixはすでにマウスやヒトにおいて運動との併用により体脂肪蓄積を抑制することが報告されているが<sup>8,9)</sup>、その機構は不明であった。本研究の結果、運動とAA-Mixの併用は褐色脂肪細胞化を誘導することが明らかとなり、すでに報告されている併用効果の機構は、褐色脂肪細胞化誘導で説明できるのではないかと考えられた。さらにこの併用による誘導機構の一つとして、IL-6の分泌促進の関与を示すことができた。以上の結果は、特定のアミノ酸摂取と運動の併用が褐色脂肪細胞化誘導の増幅を引き起こす新しい事例の一つとして位置づけられる。今後はIL-6ノックアウトマウス等を用いた検証、さらに他のマイオカインの関与を明らかにすること、ヒトにおいても運動とAA-Mixの

併用による体脂肪蓄積抑制作用における褐色脂肪細胞化誘導の関与を立証すること、などが課題である。

本研究では、運動とAA-Mixの併用による褐色脂肪細胞化誘導に加えて、さらに肥満予防以外の複合的な効果として低体温などの抑制、免疫への好ましい影響も期待できるのではないかと考えた。そのため、熱産生計測のための組織温の直接計測法やポジティブコントロールとして $\beta$ 3-アドレナリン受容体アゴニスト投与での検証などを実施したが、運動との併用において正確に検証することが計測上困難な面があり、残念ながら本報告に耐えうる結果の提示には至らなかった。今後は本研究助成により得られた成果をもとにして上記の課題を克服し、運動と食を通じたヒトの健康に貢献するよう努める。

### 謝辞

本研究の実施にあたり、ご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ならびにご関係の皆様様に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Ishibashi J., Seale P., Beige can be slimming, *Science*, **328**: 1113–1114 (2010)
- 2) Stanford K., Middelbeek I.R.J., Townsend K.L., Lee M.Y., Takahashi H., So K., Hitchcox K.M., Markan K.R., Hellbach K., Hirshman M.F., Tseng Y.H., Goodyear L.J., A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis, *Diabetes*, **64**: 2002–2014 (2015)
- 3) Díaz B.O., Flores M.R., Muñoz V.S., Preciado, F.M., Ortega S.O., Elias V.B., Guzmán G.B., Monge R.O., García E.G., González B.P., Molina M.T.V., Salazar M.S., Puente B.A., Exercise induces white adipose tissue browning across the weight spectrum in humans, *Front. Physiol.*, **9**: 1781 (2018)
- 4) Fisher F.M., Kleiner S., Douris N., Fox E.C., Mepani R.J., Verdeguer F., Wu J., Kharitonov A., Flier J.S., Flier E.M., Spiegelman B.M., FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis, *Genes Dev.*, **26**: 271–281 (2012)
- 5) Knudsen, J.G., Murholm M., Carey A.L., Biensø R.S., Basse A.L., Allen T.L., Hidalgo J., Kingwell B.A., Febbraio M.A., Hansen J.B., Pilegaard, H., Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCP1 expression in subcutaneous white adipose tissue, *PLoS One*, **9**: e84910 (2014)
- 6) Nishikawa S., Aoyama H., Kamiya M., Higuchi J., Kato A., Soga M., Kawai T., Yoshimura K., Kumazawa S., Tsuda T., Artepillin C, a typical Brazilian propolis-derived component, induces brown-like adipocyte formation in C3H10T1/2 cells, primary inguinal white adipose tissue-derived adipocytes, and mice, *PLoS One*, **11**: e0162512 (2016)
- 7) Nishikawa S., Kamiya M., Aoyama H., Nomura M., Hyodo T., Ozeki A., Lee H., Takahashi T., Imaizumi A., Tsuda T., Highly dispersible and bioavailable curcumin but not native curcumin induces brown-like adipocyte formation in Mice, *Mol. Nutr. Food Res.*, **62**: 1700731 (2018)
- 8) Ueda K., Sasai H., Tsujimoto T., Sanbongi C., Ikegami S., Kobayashi H., Shioya N., Suzuki S., Nakata, Y., Randomized trial of amino acid mixture combined with physical activity promotion for abdominal fat reduction in overweight adults, *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **11**: 23–33 (2018)
- 9) Ueda K., Sanbongi C., Takai S., Ikegami S., A combination of exercise and amino acid mixture supplementaion comprised of arginine, alanine and phenylalanine reduces diet-induced obesity in mice, *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **45**: 1289–1294 (2017)
- 10) Tanimura Y., Aoi W., Takanami Y., Kawai Y., Mizushima K., Naito, Y., Yoshikawa T., Acute exercise increases fibroblast growth factor 21 in metabolic organs and circulation, *Physiol. Rep.*, **4**: e12828 (2016)
- 11) Roberts L.D., Boström P., Sullivan J.F., Schinzel R.T., Lewis G.D., Dejam A., Lee Y.K., Palma M.J., Calhoun S., Georgiadi A., Chen M.H., Ramachandran V.S., Larson M.G., Bouchard C., Rankinen T., Souza A.L., Clish C.B., Wang T.J., Estall J.L., Soukas A.A., Cowan C.A., Spiegelman B.M., Gerszten R.E.,  $\beta$ -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic  $\beta$ -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab.*, **19**: 96–108 (2014)
- 12) Rao R.R., Long J.Z., White J.P., Svensson K.J., Lou J., Lokurkar I., Jedrychowski M.P., Ruas J.L., Wrann C.D., Lo J.C., Camera D.M., Lachey J., Gygi S., Seehra J., Hawley J.A., Spiegelman B.M., Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*, **157**: 1279–1291 (2014)