

時間運動学を基盤とした運動による抗肥満効果の解明 ーメラトニンの役割に着目してー

同志社大学 加藤 久 詞
(共同研究者) 同 大澤 晴 太

Research on Exercise-Induced Anti-Obesity Effects Based on Chrono-Exercise -A Focus on The Role of Melatonin-

by

Hisashi Kato
*Organization for Research Initiatives and Development,
Doshisha University*
Seita Osawa
*Faculty of Health and Sports Science,
Doshisha University*

ABSTRACT

Epidemiological studies and animal studies have shown that regular exercise is effective for preventing and improving obesity and diabetes. Melatonin manipulates wide variety of biological processes including circadian rhythms, immune functions, and antioxidant properties. Here, the present study aimed to investigate the effect of daily melatonin administration on exercise training-induced alteration of body and adipose tissue weights, profiles of adipokines, and antioxidant properties in rats. Two experiments were conducted in this study. First, rats were randomly divided into five groups: normal diet- fed plus sedentary, high-fat diet (HFD) -fed plus sedentary, HFD-fed plus melatonin plus sedentary, HFD-fed plus exercise, and HFD-fed plus melatonin plus exercise group. Rats were subjected to treadmill running and/or melatonin (7.5

mg/kg body weight, i.p.) for 9 weeks. Second, rats were randomly assigned to a control and sedentary (CS) group, control and voluntary exercise (CV) group, and melatonin and voluntary exercise (MV) group. The exercise rats were subjected in cages equipped with running wheels where voluntary access to physical activity was available at all times for 11 days. After exercise training periods, serum and mature adipocyte isolated from inguinal adipose tissue were analyzed. We showed that body weight and fat mass were lower in exercise with combination with melatonin group than in other groups. The expression of inflammatory adipokines were reduced, whereas anti-obesity cytokine, FGF-21 was dramatically enhanced in combined group. Furthermore, the levels of beige adipocyte markers in MV group were significantly higher than CS and CV group. These results suggest that exercise with daily melatonin administration may contribute to efficient control of body mass and adiposity.

要 旨

運動は、肥満を改善し生活習慣病を予防する。松果体ホルモンであるメラトニンは強力な抗酸化能を有し、抗肥満効果が期待されている。本研究では、運動効果の最大化を目指し、運動による抗肥満効果に及ぼすメラトニンの影響を検討した。実験にはWistar雄性ラットを使用し、トレッドミルを用いた9週間の運動トレーニング実験と回転輪付きケージを用いた11日間の自発運動実験を実施した。介入終了後、採取した血液および鼠蹊部脂肪組織から血清および成熟脂肪細胞を調整し、アディポカインの網羅的解析および脂肪細胞の機能およびベージュ化に関連する項目を評価した。その結果、運動とメラトニンの併用は体重および脂肪組織重量を顕著に減少させ、さらに炎症性のアディポカイン分泌を減少させた。また血中の抗酸化能を亢進させ、ベージュ脂肪細胞のマーカータンパク質の発現量も増加させた。これらの結果は、メラトニンが運動による抗肥満効果を増強する可能性を示唆している。

緒 言

我が国も含め、欧米諸国を中心とする先進諸国では、運動不足や過栄養などの生活習慣の変化に伴い、肥満者が急増している。内臓脂肪蓄積型の肥満は、糖尿病や脂質異常症、動脈硬化症をはじめとする生活習慣病の発症やそれに伴う合併症のリスクを大きく高め、生活の質を著しく低下させるため、肥満の予防・改善は健康寿命の延伸や医療費削減の観点から喫緊の課題である¹⁾。肥満による生活習慣病の発症は、肥大した脂肪細胞の酸化ストレスや炎症性サイトカインの産生の増大によるインスリン抵抗性の惹起が要因のひとつであることから、肥満の予防・改善には、脂肪細胞の小型化や炎症性サイトカインの産生・分泌を抑制することが重要となる。

定期的な運動は、肥満を改善し生活習慣を予防することが大規模な疫学調査によって実証されている²⁾。さらに多くの運動介入実験によって、運動は体重や脂肪組織重量の減少、炎症性サイトカインの産生・分泌を抑制する効果があることを報告している³⁾。人々は運動の有用性に気づき、理解しているにもかかわらず、実際に運動習慣のあ

る人の割合は少なく、運動習慣者の増加は最重要課題である。多忙な現代人に運動習慣を身に付けさせるために重要となってくるのが「いかに効率よく運動効果を最大化させるか」である。運動が肥満や慢性炎症を改善させる分子機序の解明に取り組んだ研究は多く存在するが、運動効果を最大化させるための効率的な運動プログラムの開発やそのエビデンス解明を試みた研究は少ない。

睡眠・覚醒リズムや体温・血圧調節など、ほとんどの生理機能には1周期が約24時間の概日リズムが認められており、これらは視床下部の視交叉上核をはじめ、全身の組織・細胞に発現する時計遺伝子群の転写・翻訳を介したネガティブ・フィードバックにより制御されている⁴⁾。またエネルギー代謝や糖・脂質代謝にも概日リズムが存在することから、運動による代謝亢進作用などの健康増進効果は、運動のタイミングによって異なる可能性が考えられるが、運動のタイミングとその効果を検証した「時間運動学」の研究報告は少ないのが現状である。近年、加藤らは時計遺伝子 Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein-1 (BMAL1) の役割に着目し、BMAL1発現量の高い時間帯での運動トレーニング (TR) は、BMAL1発現量の低い時間帯のTRと比較して顕著に体重や脂肪組織重量を減少させることを報告した⁵⁾が、BMAL1は光刺激によって発現が消失してしまうため、この結果を実際にヒトへ応用することは難しい。そこで本研究は、概日リズムを調節するホルモン「メラトニン」に着目した。メラトニンは脳内の松果体で生合成され、概日リズム調節の他に多くの生理機能を有し、中でも近年では肥満との関連が注目されている⁶⁾。メタボリックシンドローム該当者は、メラトニン分泌異常を呈することやメラトニン投与は体重や脂肪組織重量を減少させること、さらに松果体切除ラットは、運動による脂肪分解反応の亢進が消失すること⁷⁾が報告されている。さらにメ

ラトニンの分泌の概日リズムは、BMAL1と類似したパターンであるため、運動による抗肥満効果を最大化させるためのキーワードはメラトニンにあると考えた。

本研究では「メラトニンは運動による抗肥満効果を増強する」という仮説のもと、トレッドミルを用いた9週間の運動トレーニング実験と回転輪付きケージを用いた11日間の自発運動実験を実施し、アディポカイン分泌の変動や脂肪細胞の脂肪合成・分解、脂質代謝への影響、さらに脂肪細胞のベージュ化へ及ぼす影響などを検討し、運動による抗肥満効果に及ぼすメラトニンの役割を解明することを目的とした。

1. 実験方法

1. 1 実験動物

実験には4週齢のWistar雄性ラット（清水実験材料）を用いた。ラットは一定の温度・湿度（室温24度±1度、湿度45%±5%）および12時間毎の明暗条件の管理下で、水分および餌を自由に摂取できる条件で飼育した。購入したラットは飼育環境に順応させるため、1週間の予備飼育を実施した後に本実験を開始した。すべての動物実験は同志社大学動物実験規定を遵守し、倫理審査委員会の承認を得て行われた。

1. 2 飼育条件

1週間の予備飼育後の35匹の5週齢ラットを通常食餌摂取群 (ND, n=7) および高脂肪食餌摂取群 (HFD, n=28) に群分けし、8週間自由摂取させた。通常食餌摂取群は摂取カロリー換算で脂質13%を含む食餌を摂取させ、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（リサーチダイエツト社）を摂取させた。8週間の栄養介入終了後、20匹の高脂肪食餌摂取群を各群の平均体重が同等となるように4群に分け、以下の5群を設定した。通常食餌摂取+メラトニン非

投与 + 安静群 (NNS: ND-fed + No melatonin + Sedentary control, n=7), 高脂肪食餌摂取 + メラトニン非投与 + 安静群 (HNS: HFD-fed + N + S, n=7), 高脂肪食餌摂取 + メラトニン投与 + 安静群 (HNS:H + Melatonin treatment + S, n=7), 高脂肪食餌摂取 + 非メラトニン投与 + 運動トレーニング群 (HNT:H + N + Exercise training, n=7) および高脂肪食餌摂取 + メラトニン投与 + 運動トレーニング群 (HMT, n=7). メラトニン投与および運動トレーニング (TR) の介入期間は9週間とした. メラトニンの投与濃度は体重1kgあたり7.5mgとし, TRの実施日に合わせて週5回, TRの開始3時間前に腹腔内に投与した. なお, メラトニン非投与群のラットにはメラトニンを含まない同様の溶媒を投与した. すべてのラットは週3回, 同時刻に体重および食餌量の測定を実施した. 実験デザインを図1に示した.

1. 3 運動トレーニングプロトコル

運動トレーニングは, 13週齢から21週齢までの9週間実施した. 運動様式は小動物用トレッド

ミル装置 (室町機械) を用いた走運動を採用し, 週5回の頻度で実施した. 運動強度は1回30分間, 速度15m/min, 傾斜5%の条件で開始して, 1週毎に運動時間, 速度を増加させていき, 9週目には1回90分間, 速度27m/min, 傾斜5%とした. なお, 運動実施の時間帯は毎回固定し, 血中メラトニン濃度が低い時間帯である明期の終わり (zeitgeber time = 10~12) に実施した.

1. 4 自発運動モデル

8週齢まで通常飼育した12匹のラットをコントロール溶媒投与 + 安静群 (CS: Control + Sedentary), コントロール溶媒投与 + 自発運動群 (CV: C + Voluntary exercise) およびメラトニン投与 + 自発運動群 (MV: Melatonin + V) の3群に分けた. 自発運動群は周長1m, 内径310mm, 幅84mmの回転輪 (メルクエスト社) を取り付けたケージで飼育し, 自由に運動させた. 介入期間はStanfordら⁸⁾を参考に11日間とした. 実験デザインを図2に示した.

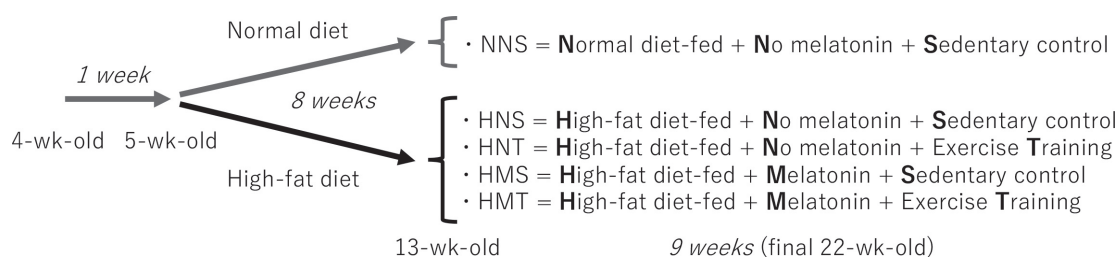


図1 9週間の運動トレーニング実験のデザイン

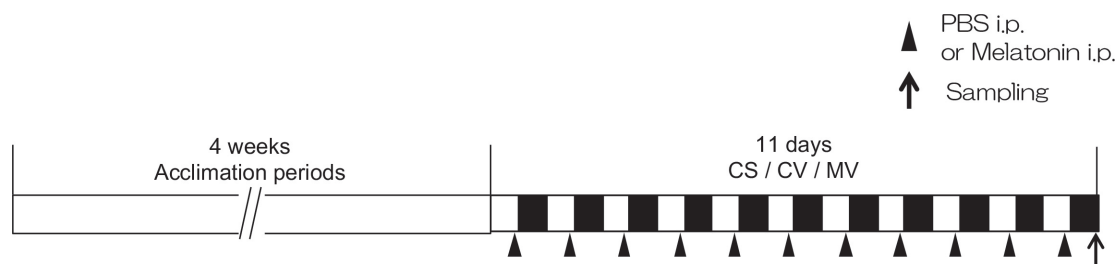


図2 自発運動実験のデザイン

1. 5 検体採取

9週間の運動トレーニング期間終了後および11日間の自発運動介入期間終了後にラットを解剖し、検体を採取した。検体採取は運動期間最終日の一過性の運動の影響を取り除くため、最後の運動終了後から少なくとも36時間以上空けて実施した。解剖はラットを麻酔下で採血し、その後ペントバルビタールナトリウムの過剰投与によって確実に安楽死させ、白色脂肪細胞組織（鼠径部、精巣周囲、後腹壁、腸間膜）を採取した。鼠径部および精巣周囲脂肪組織の一部はコラゲナーゼ処理にて成熟脂肪細胞を単離し、その他の脂肪組織は採取直後に液体窒素にて凍結し、実験に使用するまで-80℃の超低温フリーザーにて保存した。

1. 6 成熟脂肪細胞の単離と脂肪細胞サイズ測定

脂肪細胞解剖時に採取した鼠径部および精巣周囲脂肪組織をPBS (-) で洗い、血液や血管、膜などの組織を除去した後、0.1%のコラゲナーゼを含むアッセイバッファー（Krebs - Ringer bicarbonate solution buffered with 10 mM HEPES, pH 7.4, containing 5.5 mM glucose and 2.5% (w/v) fatty acid - free bovine serum albumin）の中に入れ、はさみで細かくミンチした。その後37℃に加温したウォーターバス中で45分間インキュベートし、反応後の細胞をポリエステルメッシュで濾し、遠心分離（500g, 10分間, 室温）した。遠心分離後の細胞塊を成熟脂肪細胞とし、脂肪細胞サイズ測定、ウエスタンブロットおよびリアルタイムPCRに使用した。

脂肪細胞サイズ（直径）の測定は、鼠蹊部脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を対象に行なった。ヘモサイトメーターに成熟脂肪細胞を注入し、蛍光顕微鏡（BZ-800, キーエンス社）の明視野モードで撮影した画像を付属の解析ソフト（BZ-X100 Analyzer）を用いて定量化した。ラット1匹

あたり5枚の画像を撮影し、5枚分の平均値をラット1匹の脂肪細胞のサイズとした。

1. 7 ウエスタンブロッティング

鼠蹊部脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を用い、プロテアーゼおよびフォスファターゼ阻害剤を含んだRIPAバッファー（ATTO社）でホモジナイズし、遠心分離後の可溶化タンパク質を使用した。タンパク濃度はBCA（Bicinchoninic acid）法により測定した。8-15%のポリアクリルアミドゲル（ナカライテスク社）を用いて電気泳動を行なった後、PVDFメンブレンに転写した。転写後のメンブレンをブロッッキング剤（Bullet Blocking One for Western Blotting, ナカライテスク社）に浸し、室温にて10分間浸透させ、測定するタンパクを特異的に認識する一次抗体（1000-2000倍希釈）と反応（4℃, 12時間以上）させた。翌日、対応した二次抗体（2500倍希釈）で反応（室温, 60分間）させた後、化学発光検出試薬（ATTO社）にて発色し、イメージアナライザー（ChemiDocMPシステム, Bio-Rad社）を用い撮影した。撮影したタンパク質画像是画像解析ソフトImageJ（National Institute of Health）で定量化した。なお、内在性コントロールとして β -actinを使用した。実験に用いた一次抗体のリストは表1に示した。

表1 本研究で使用した一次抗体

抗体名	メーカー	品番
PGC1 α	Merck Millipore	#AB3242
UCP1	abcam	ab10983
VEGF	Novus Biologicals	NB100-664
β -actin	abcam	ab8226

1. 8 リアルタイムPCR

鼠蹊部脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞のTotal RNA は、RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit（QIAGEN）を用いて抽出した。その後、分光光度計Nano-200（エア・ブラウン社）を用いて、

表2 本研究で使したプライマー配列一覧

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Lipe	TTGCCTACTGCTGGGCTGTC	GACACGGTGATGCAGAGGTTC
Fas	TGGGCCAGCTTCTTAGCC	GGAACAGCGCAGTACCGTAGA
Acc	TGAAGGGCTACCTCTAATG	TCACAACCCAAGAACCAC
Leptin	TGACAAACAGGTTACAGGACCAGA	ACGAAACCCGATCCAGTTCA
Ppar γ	GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG	TGCAGCAGGTTGTCTTGGATG
Ppar α	GGCAATGCACTGAACATCCAG	GCCGAATAGTTCGCCGAAAG
Ppar δ	GCAGGCTCTAGAATTCCATC	GTGCAGCCTTAGTACATGTC
18S	AAGTTTCAGCACATCCTGCGAGTA	TTGGTGAGGTCAATGTCTGCTTTC

RNAの濃度およびクオリティを測定した。得られたTotal RNAから、PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社)を用いて、逆転写反応によりcDNAを合成した。cDNAはKAPA SYBR Fast qPCR Kit (日本ジェネティクス社)を用いて、StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)により定量した。内在性コントロールとして、18S Ribosomal protein (18S)を用い、18Sに対する各mRNA発現レベルの相対的発現量を測定した。実験に用いたプライマーのリストは表2に示した。

1. 9 酸化ストレス・抗酸化ストレスレベル測定

自発運動実験のラットから採取した血液から血清を調整し、フリーラジカル解析装置 (FREE Carrio Duo, ウィスマー社)を用いて酸化ストレスレベルを評価した。この解析装置では、血液中のヒドロペルオキシドの濃度を測定し、生体の酸化ストレス度を測定する diacron reactive oxygen metabolites (d-ROMs) テストおよび生体の抗酸化能力を評価する biological antioxidant potential (BAP) テストの2種類の測定が可能であり、測定マニュアルに従い分析した。

1. 10 アディポカインアレイ解析

9週間の運動トレーニング実験のラットから採取した血液を遠心分離し、血清を回収した後、Proteome Profiler Rat Adipokine Array Kit (ARY016, R&D Systems社)を用いて、測定マニ

アルに従い測定した。各群から3匹ずつ無作為に選ばれたラットの血清を等量混合したものを試料とし、同一メンブレン上の2カ所のスポットの化学発光強度を画像解析ソフト ImageJを用いて定量化し、その平均値を測定データとした。なお、得られたスポットの発光強度は同一メンブレン上の陽性コントロールの平均発光強度で補正し、ヒートマップで表した。さらに顕著な変化を示したアディポカインは、NNS群を1とした相対発光強度で示した。

1. 11 統計解析

データはすべて平均値±標準偏差で表した。統計処理は2群間の平均値の比較には、スチューデントのT検定を用い、3群間および5群間の比較には一元配置分散分析を用い、有意水準は5%未満とした。さらに多重比較検定はBonferroni testを行い、有意水準は5%未満とした。

2. 実験結果

2. 1 運動トレーニング実験後の体重と脂肪組織重量

9週間の運動トレーニング実験終了時の体重および脂肪組織重量を評価した。その結果、HNS群において、他のすべての群と比較して有意に高値を示し、さらにHMS群と比較してHMT群において有意に低値を示した (図3A)。皮下脂肪である鼠蹊部脂肪組織の重量および内臓脂肪である精巣周囲脂肪組織を体重で除した値は、HNS群において、他のすべての群と比較して有意に高値

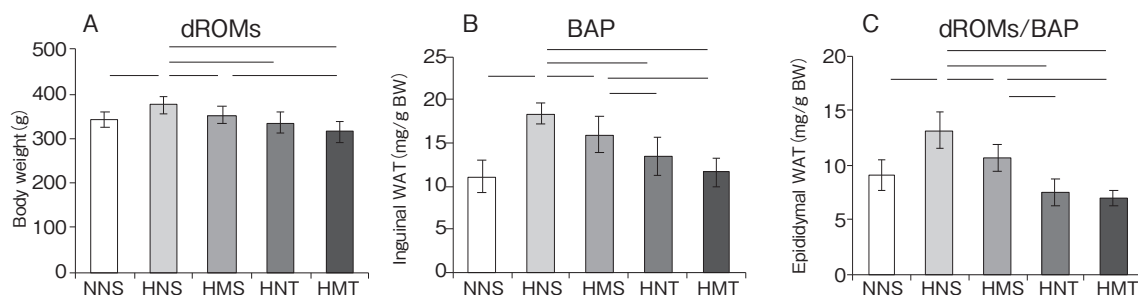


図3 9週間の運動トレーニング後の体重および白色脂肪組織重量
A) 体重, B) 鼠蹊部脂肪組織重量, C) 精巣周囲脂肪組織重量, 平均値±標準偏差, * $p<0.05$

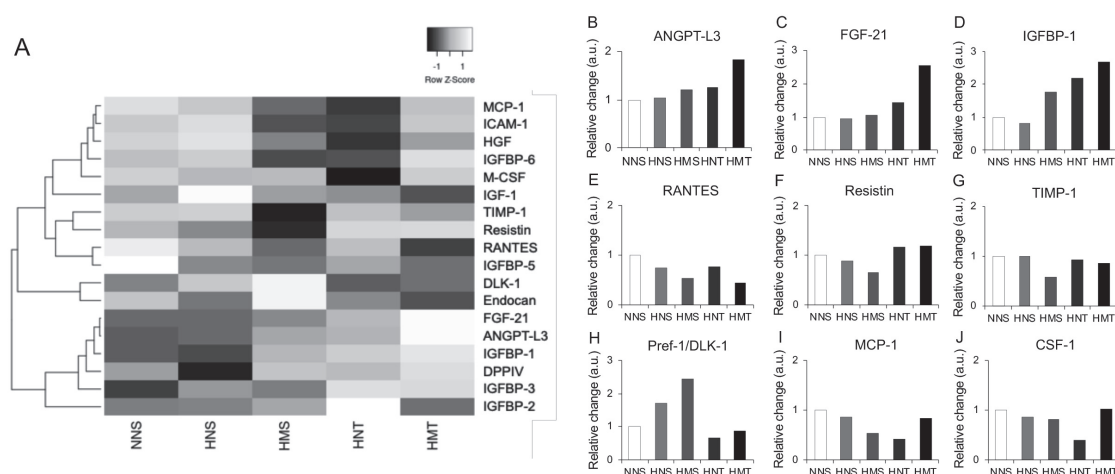


図4 9週間の運動トレーニングにおける血清中のアディポカイン分泌量の変化
各群3匹分の血清を等量混合したものを用いた。A) ヒートマップ, B) ANGPT-L3, C) FGF-21, D) IGFBP-1, E) RANTES, F) Resistin, G) TIMP-1, H) Pref-1, I) MCP-1, J) CSF-1.

を示し, さらにHMS群と比較してHNT群およびHMT群において有意に低値を示した (図3B, C)。

2.2 アディポカインの網羅的解析

9週間の運動トレーニング実験のラットから採取した血清を対象にアディポカインの網羅的解析を実施した。その結果, 18種類のアディポカインが検出され, その分泌量をヒートマップに表した (図4A)。さらに検出されたアディポカインの中で顕著な変化を示した9つのアディポカインを抽出し, 定量化した (図4B-J)。ANGPT-L3, FGF-21, IGFBP-1はHMT群で分泌量が増加し (図4B-D), RANTESはHMS群とHMT群で分泌量が減少した (図4E)。さらにResistin, TIMP-1はHMS群のみで分泌量が減少した (図4F, G)。ま

たPref-1はHMS群で高値を示し, HNT群で低値を示した (図4H)。最後にMCP-1, CSF-1はHNT群で分泌量が最も低下した (図4I, J)。

2.3 血清中の酸化ストレス・抗酸化ストレスレベル

近年, 酸化度を示す Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) および抗酸化力を示す Biological Anti-Oxidant Potential (BAP) という指標が開発された⁹⁾。従来の酸化ストレス測定は発生した活性酸素種 (ROS) によるタンパク質や脂質の酸化物の増減や体内の抗酸化物質の増減などを個別に評価していたのに対し, d-ROMsは血中のヒドロキシペルオキシド (ROOH) 濃度を測定し, 生体内の酸化ストレス度を総合的に評価する指標であ

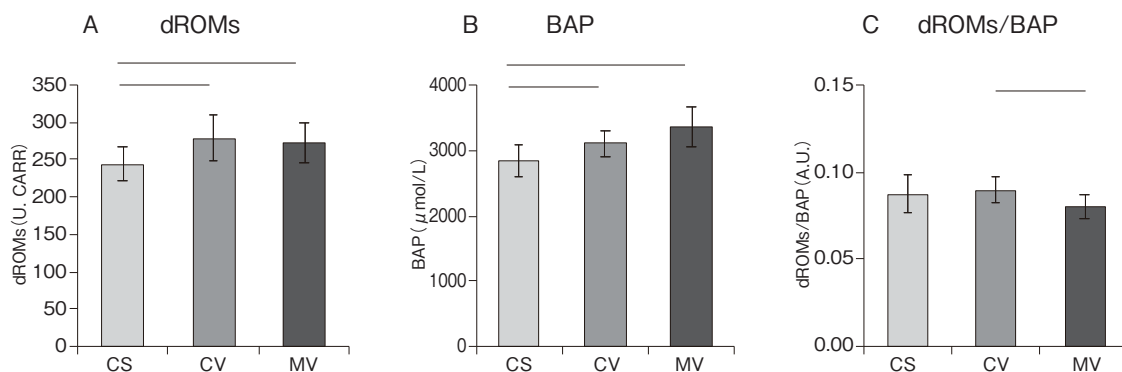


図5 11日間の自発運動後の血清中のdROMs, BAPおよび潜在的抗酸化能
A) dROMs: 酸化ストレス値, B) BAP: 抗酸化ストレス値, C) 潜在的抗酸化能. 平均値±標準偏差. * $p<0.05$

り, BAPは酸化鉄をどの程度還元できるかという還元力(抗酸化力)を測定する指標であり, 酸化-還元反応を用いて測定する方法である. 11日間の自発運動介入の結果, dROMs, BAPともに, CS群と比較してCV群およびMV群において, 有意に高値を示した(図5A, B). さらに潜在的抗酸化能はCV群と比較して, MV群において有意に低値を示した(図5C).

2. 4 自発運動後の体重, 脂肪組織重量と成熟脂肪細胞サイズ

自発運動介入実験の結果, 体重, 鼠径脂肪組織および精巣周囲脂肪組織を体重で除した値は, CS群と比較して, CV群, MV群において有意に低値を示し, さらに脂肪組織重量においてはCV群と比較してMV群において有意に低値を示した(表3). また鼠蹊部脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞のサイズを測定したところ, MV群において他の2群と比較して, 有意な脂肪細胞サイズの減少を認めた(図6).

2. 5 自発運動による皮下脂肪細胞の脂肪細胞マーカー発現の変動

脂肪組織は体積の90%以上を成熟脂肪細胞が占めるが, 他の細胞成分(前駆脂肪細胞, 間葉系幹細胞, 血管構成細胞など)も豊富に存在しており, 組織内の細胞数でみると脂肪細胞は半分未満であると予測されている^{10, 11)}. そこで脂肪細胞に及ぼす運動およびメラトニンの影響を検討するため, 脂肪組織をコラゲナーゼ処理後に遠心分離

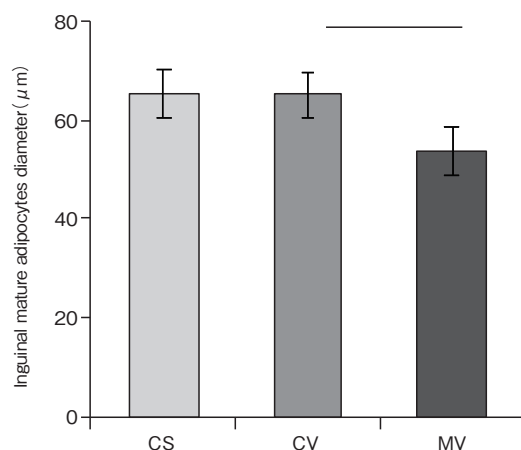


図6 11日間の自発運動後の成熟脂肪細胞サイズ
平均値±標準偏差. * $p<0.05$

表3 11日間の自発運動後の体重および白色脂肪組織重量

	Body weights (g)	Inguinal (mg/g BW)	Epididymal (mg/g BW)
CS	265 ± 19.7	10.40 ± 1.1	8.41 ± 1.2
CV	231 ± 7.2*	10.12 ± 0.9*	8.32 ± 1.0*
MV	226 ± 7.1 *	8.07 ± 1.1 * †	6.70 ± 1.2* †

平均値 ± 標準偏差. *vs. CS, $p<0.05$, † vs. CV, $p<0.05$

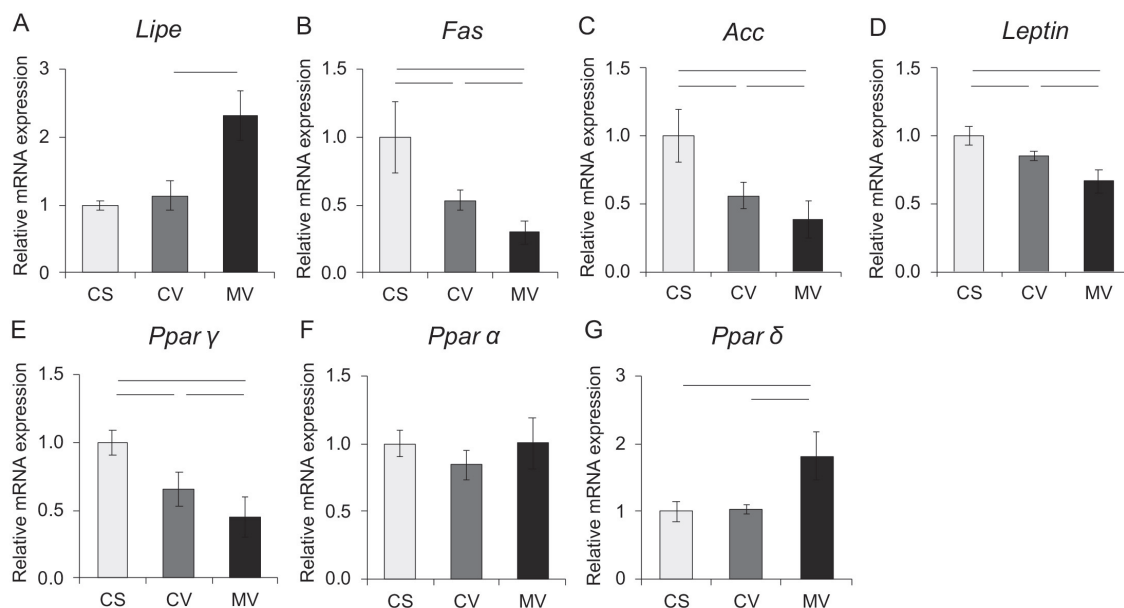


図7 11日間の自発運動後の皮下脂肪細胞における脂肪細胞マーカー発現量

A) Lipe. B) Fas (Fatty acid synthase). C) Acc (acetyl-CoA carboxylase). D) Leptin.

E) Ppar (peroxisome proliferator-activated receptor) γ . F) Ppar α . G) Ppar δ . 平均値 $\pm$ 標準偏差. $p < 0.05$

することで成熟脂肪細胞とその他の細胞群である間質血管細胞群に分画し、実験を実施した。11日間の自発運動介入後に鼠蹊部脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、脂肪細胞マーカーのmRNA発現量を解析した結果、脂肪分解関連因子であるホルモン感受性リパーゼ (Lipe) および核内受容体 Ppar δ は、MV 群において他の2群と比較して有意に増加した (図7A, G)。また脂肪合成関連因子である脂肪酸合成酵素 (Fas)、アセチルCoAカルボキシラーゼ (Acc)、食欲抑制ホルモンとして知られるレプチン、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである核内受容体 Ppar γ のmRNA発現量は、CS群と比較して、CV群、MV群で有意に減少し、さらにCV群と比較してMV群で有意に低値を示した (図7B-E)。脂肪酸酸化に関連する核内受容体 Ppar α mRNA発現量は顕著な変化は認められなかった (図7F)。

2.6 自発運動による皮下脂肪細胞のベージュ脂肪細胞マーカー発現の変動

白色脂肪組織の中でもとりわけ皮下脂肪組織に

エネルギー消費を増大させる作用をもつベージュ脂肪細胞が存在することが知られている^{12,13)}。ベージュ脂肪細胞の活性と熱産生機能は肥満に伴い低下すること¹⁴⁾、さらに成人の肩甲骨周辺に豊富に存在する褐色脂肪組織のほとんどは、ベージュ脂肪細胞の特徴を有すること^{15,16)}が明らかにされ、代謝機能の亢進を目的としたベージュ脂肪細胞の活性化させる治療法の開発およびベージュ脂肪細胞の量と質を制御する分子機構の解明が期待されている。また運動^{17,18)}およびメラトニン投与¹⁹⁾は皮下脂肪組織内のベージュ脂肪細胞を活性化させることが報告されているが、それらを組み合わせた研究は少ない。本研究の結果、運動+メラトニン投与の併用によって、ベージュ脂肪細胞のマーカーである PGC1 α 、UCP1、さらにベージュ脂肪細胞の活性化に関与する²⁰⁾血管内皮増殖因子 VEGF のタンパク質発現量はMV群において、他の2群と比較して、有意に増加した (図8A-D)。

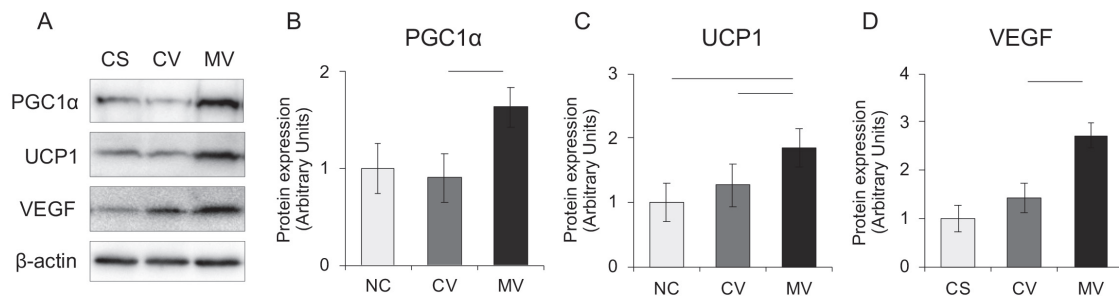


図8 11日間の自発運動後の皮下脂肪細胞におけるベージュ脂肪細胞マーカー発現量

A) ウェスタンブロットの代表的な撮影像. B) PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α). C) UCP1 (Uncoupling protein 1). D) VEGF (Vascular endothelial growth factor). 平均値 $\pm$ 標準偏差. $p < 0.05$

3. 考 察

本研究では、運動による体重および脂肪組織重量の減少、炎症性アディポカインの産生・分泌の減少、抗酸化能の亢進など、多くの研究が報告している運動による抗肥満効果³⁾に及ぼすメラトニンの役割を解明することを目的とした。その結果、運動とメラトニンの併用は体重および脂肪組織重量の顕著な減少や炎症性アディポカイン分泌の減少、さらには抗酸化能の亢進や脂肪細胞のベージュ化などの変化をもたらし、抗肥満効果を発揮することを明らかにした。本研究では、脂肪細胞の培養系を用いたメラトニンの作用機序解明までは至っておらず、得られた結果の因果関係を証明することはできなかったが、メラトニンの有用性を高める結果を示唆した。

トレッドミルを用いた9週間の運動トレーニング実験では、非メラトニン+非運動(HNS)群と比較して、メラトニン単独(HMS)群、運動単独(HNT)群およびメラトニン+運動(HMT)群において体重、脂肪組織重量の有意な減少がみられ、多くの先行研究で報告されている通り、メラトニンおよび運動トレーニングによる抗肥満効果を確認できた。しかし、HMS群およびHMT群とHMT群との間に有意な差は認められなかった。本研究と同様に運動とメラトニンの併用実験を実施した研究²¹⁾でも、体重および脂肪組織重

量の減少には併用の効果はみられない一方で、運動とメラトニンの併用によって血中の脂質異常の改善や骨格筋内のミトコンドリア機能および抗酸化能の向上が認められ、全身のインスリン感受性が亢進したという報告がされている。本研究では骨格筋の解析は実施していないが、血中の中性脂肪レベルはHMT群で低い傾向にあった(data not shown)ことから同様の適応が生じている可能性が考えられる。また血清中のアディポカインの網羅的解析では18種類のアディポカインが検出され、クラスタリング解析を実施すると、メラトニン単独(HMS群)で変動するアディポカイン(Resistin, TIMP-1, Pref-1)、運動単独(HNT群)で変動するアディポカイン(MCP-1, CSF-1)、メラトニンと運動の併用(HMT群)で変動するアディポカイン(RANTES, ANGPTL3, FGF-21, IGFBP-1)に分類された(図4)。中でもHMT群で顕著に分泌が増加したFGF-21は、脂質代謝やインスリン感受性の亢進、さらに脂肪細胞のベージュ化促進など多岐にわたる機能を有しており、抗肥満効果が期待されているサイトカインであり²²⁾、運動によって分泌が増加することも知られている²³⁾。今回、HMT群においてHNT群と比較して分泌量が約2倍増加しており、その作用機序解明は今後の課題であるが、運動+メラトニンの併用による新しい健康増進効果として期待される。

11日間の自発運動実験では、トレッドミルを

用いた運動トレーニング実験と異なり、運動単独 (CV) 群と比較して、メラトニン+運動 (MV) 群において、体重、脂肪組織重量および成熟脂肪細胞のサイズの有意な減少が認められた (表3, 図6)。これには脂肪細胞の形質転換が関与している。介入後の鼠蹊部脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を対象とした解析では、MV群において脂肪分解に関連する *Lipe* の発現量が増加し、反対に脂肪合成に関連する *Fas* および *Acc* の発現量や脂肪分化のマスターレギュレーターである *PPAR γ* の発現量が減少した (図7A-C, E)。さらに脂肪組織において脂肪酸代謝亢進作用を有し、抗肥満およびインスリン抵抗性改善効果を発揮する *Ppar δ* ²⁴⁾ の発現量もMV群で有意に増加していた (図7G) ことから、メラトニン+運動の併用によって、抗肥満の表現系を有した脂肪細胞へ形質転換した可能性を示唆した。さらにMV群の鼠蹊部脂肪細胞において、ベージュ脂肪細胞マーカーである *PGC1 α* 、*UCP1* およびベージュ脂肪細胞の活性化に関与する *VEGF* のタンパク発現量が増加していた (図8)。メラトニンおよび運動それぞれの単独介入によって脂肪細胞のベージュ化が生じることは多くの研究が報告している^{17, 19)} が、メラトニン+運動の併用でその効果が増幅されることは本研究が初めて発見した。またメラトニン+運動の併用は抗酸化能を高めることがよく知られており²⁵⁾、本研究も同様の結果が得られた (図5) ことから、メラトニンは運動による抗酸化能の向上を増強する可能性を改めて強く示唆した。

本研究の限界として、現時点ではメラトニン+運動の併用の効果はタンパク質発現や遺伝子発現の測定のみであることが挙げられる。本研究で得られた血中アディポカインの分泌量変動や鼠蹊部脂肪細胞の形質転換が、実際に脂肪組織・細胞内で生じているのかの確認、分子機序の解明、また全身へどの程度影響を及ぼしているのかについては今後の検討課題である。さらにメラトニン+運

動の併用効果は全身に及ぶことが考えられるため、今後は従来の研究法であった単一の臓器や細胞のみに焦点を絞るのではなく、臓器連関や細胞間コミュニケーションといった切り口からの検証も必要であろう。

4. 結 論

運動にメラトニンを併用することで、抗炎症作用ならびに抗酸化能を亢進させ、さらに皮下脂肪細胞の代謝亢進やベージュ化を促すことで、より効率的に体重および脂肪組織重量を減少させる可能性を示唆した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、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厚く御礼申し上げます。また、実験の実施に多大なご協力をいただきました同志社大学の井澤鉄也教授、高倉久志助教に心から感謝致します。

文 献

- 1) Aronne L.J., Epidemiology, morbidity, and treatment of overweight and obesity, *J. Clin. Psychiatry.*, **62** Suppl 23: 13-22 (2001)
- 2) Bassuk S.S., Manson J.E., Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease, *J. Appl. Physiol.*, **99**: 1193-1204 (2005)
- 3) Sakurai T., Ogasawara J., Kizaki T., Sato S., Ishibashi Y., Takahashi M., Kobayashi O., Oh-ishi S., Nagasawa J., Takahashi K., Ishida H., Izawa T., Ohno H., The effects of exercise training on obesity-induced dysregulated expression of adipokines in white adipose tissue, *Int. J. Endocrinol.*, **2013**: 801743 (2013)
- 4) Panda S., Circadian physiology of metabolism, *Science*, **354**: 1008-1015 (2016)
- 5) Kato H., Ogasawara J., Takakura H., Shirato K., Sakurai T., Kizaki T., Izawa T., Exercise training-enhanced lipolytic potency to catecholamine

- depends on the time of the day, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**: 6920 (2020)
- 6) Karamitri A. and Jockers R., Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **15**: 105-125 (2019)
- 7) Borges-Silva C.N., Alonso-Vale M.I.C., Franzói-De-Moraes S.M., Takada J., Peres S.B., Andreotti S., Skorupa A.L., Cipolla-Neto J., Pithon-Curi T.C., Lima F.B., Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats, *J. Pineal. Res.*, **38**: 278-283 (2005)
- 8) Stanford K.I., Middelbeek R.J.W., 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)
- 9) Pasquini A., Luchetti E., Marchetti V., Cardini G., Iorio E.L. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs, *Vet. Res. Commun.*, **32**: 137-143 (2008)
- 10) Sarantopoulos C.N., Banyard D., Ziegler M.E., Sun B., Shaterian A., Widgerow A.D., Elucidating the preadipocyte and its role in adipocyte formation: a comprehensive review, *Stem. Cell. Rev. Rep.*, **14**: 27-42 (2017)
- 11) Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L., Redl H., Rubin J.P., Yoshimura K., Gimble J.M., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT), *Cytotherapy*, **15**: 641-648 (2013)
- 12) Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B., Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans, *Am. J. physiol. Endocrinol. Metab.*, **293**: E444-452 (2007)
- 13) Sidossis L., Kajimura S., Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis, *J. Clin. Invest.*, **125**: 478-486 (2015)
- 14) 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**: E676-E687 (2016)
- 15) 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**: 366-376 (2012)
- 16) Shinoda K., Luijten I.H., Hasegawa Y., Hong H., Sonne S.B., Kim M., Xue R., Chondronikola M., Cypess A.M., Tseng Y.H., Nedergaard J., Sidossis L.S., Kajimura S., Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes, *Nat. Med.*, **21**: 389-394 (2015)
- 17) Stanford K.I., Middelbeek R.J.W., Goodyear L.J., Exercise effects on white adipose tissue: beiging and metabolic adaptations, *Diabetes*, **64**: 2361-2368 (2015)
- 18) Lehnig A.C., Dewal R.S., Baer L.A., Kitching K.M., Munoz V.R., Arts P.J., Sindeldecker D.A., May F.J., Lauritzen H.P.M.M., Goodyear L.J., Stanford K.I., Exercise training induces depot-specific adaptations to white and brown adipose tissue, *iScience*, **11**: 425-439 (2019)
- 19) Jiménez-Aranda A., Fernández-Vázquez G., Campos D., Tassi M., Velasco-Perez L., Tan D.X., Reiter R.J., Agil A., Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats, *J. Pineal. Res.*, **55**: 416-423 (2013)
- 20) During M.J., Liu X., Huang W., Magee D., Slater A., McMurphy T., Wang C., Cao L., Adipose VEGF links the white-to-brown fat switch with environmental, genetic, and pharmacological stimuli in male mice, *Endocrinology*, **156**: 2059-2073 (2015)
- 21) Rahman M.M., Kwon H.S., Kim M.J., Go H.K., Oak M.H., Kim D.H., Melatonin supplementation plus exercise behavior ameliorate insulin resistance, hypertension and fatigue in a rat model of type 2 diabetes mellitus, *Biomed Pharmacother*, **92**: 606-614 (2017)
- 22) Kharitonov A., Shiyanova T.L., Koester A., Ford A.M., Micanovic R., Galbreath E.J., Sandusky G.E., Hammond L.J., Moyers J.S., Owens R.A., Gromada

- J., Brozinick, J.T., Hawkins E.D., Wroblewski V.J., Li D.S., Mehrbod F., Jaskunas S.R., Shanafelt A.B., FGF-21 as a novel metabolic regulator, *J. Clin. Invest.*, 115: 1627–1635 (2005)
- 23) Kim K.H., Kim S.H., Min Y.K., Yang H.M., Lee J.B., Lee M.S., Acute exercise induces FGF21 expression in mice and in healthy humans, *PLoS One*, 8: e63517 (2013)
- 24) Tanaka T., Yamamoto J., Iwasaki S., Asaba H., Hamura H., Ikeda Y., Watanabe M., Magoori K., Ioka R.X., Tachibana K., Watanabe Y., Uchiyama Y., Sumi K., Iguchi H., Ito S., Doi T., Hamakubo T., Naito M., Auwerx J., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J., Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 15921-15929 (2003)
- 25) Kruk J., Aboul-Enein B.H., Duchnik E., Exercise-induced oxidative stress and melatonin supplementation: current evidence, *J. Physiol. Sci.*, 71: 27 (2021)