

論 文 要 旨

Effect of Exercise and High-fat Diet on Plasma Adiponectin and Nesfatin Levels in Mice

〔 運動と高脂肪食の血中アディポネクチン及び nesfatin に
及ぼす影響 〕

呼和朝魯,

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

肥満、糖尿病、高脂血症などは世界中で注目されている生活習慣病である。生活習慣病の発症や進展は過食、運動不足、遺伝と深く結びついていることが知られている (Yamauchi et al. 2002, Hara et al. 2002)。運動不足は余剰のエネルギーを蓄積させる脂肪を増やすだけでなく、骨や筋肉などの機能も低下させる。

Nesfatin-1 は、前駆体タンパク質が nucleobindin-2 である最近発見された摂食抑制ペプチドである (Cowley et al. 2006)。Nesfatin-1 の発現は脂肪組織などの末梢組織に分布しており、また、血液中にも存在する (kawano et al. 2008)。

これまでに nesfatin-1 は摂食を抑制するのみならず、腸管運動を抑制することが報告されている。しかし、運動と高脂肪食の血中 nesfatin に及ぼす影響についてはいまだ報告がない。本研究において、運動及び高脂肪食の血中アディポネクチンと nesfatin-1 濃度に対する影響について研究する。

【材料および方法】

本研究では、7週齢のC57BL/6Jマウス (雄) 24匹 (21.06 ± 0.60 g, CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。繁殖室の温度は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は $55\% \pm 11\%$ で一定の環境下、マウスは、個別ケージにて飼育された。全ての実験は、鹿児島大学の動物実験倫理委員会において承認された。

マウスを普通食の非運動群、高脂肪食の非運動群、普通食運動群、高脂肪食運動群4群 (各6匹) に分けて4週間飼育した。全てのケージを車輪付きケージに統一し、非運動群のケージの車輪が動かないように固定し、運動群のケージの車輪をマウスは自由に動かすことが出来るようにした。摂食、摂水は自由摂取とした。運動量、摂食量、体重を毎日同じ時間に測定した。運動距離は、車輪の周囲 (0.7m) \times 車輪の回転数として計算された。4週間後に、マウスを6時間絶食にし、血液及び組織のサンプリングをした。体温はマウスの直腸に体温計を1.5cm挿入して測定した。血液サンプルはマウスをジエチルエーテル麻酔下で眼窩から採血した後、頸椎脱臼にして安楽死させ、内臓脂肪 (腸間膜脂肪と傍精巣上体脂肪) を採取し重量を測定した。血中グルコースは、簡易のグルテストセンサ (Nipro, co., Osaka, Japan) を使って測定し、血中インスリンは、酵

素免疫測定法 (ELISA) キット(Morinaga, Co., Tokyo, Japan)用いて測定した。血中コレステロールおよびトリグリセリドはそれぞれコレステロールE -テストワコーとトリグリセリドE -テストワコーキット(Wako Pure Chemical, Ind., Osaka, Japan)で測定した。マウス血中アディポネクチン(Otsuka Pharmaceutical, Co., Tokyo, Japan)、nesfatin-1(Phoenix Pharmaceuticals, Inc., CA, USA)は対応するELISAキットを用いて測定した。

【結果】

運動群のマウスの摂食量 (Kcal) は非運動群と比べ有意に増加した。高脂肪食の運動群のマウスは、非運動群のマウスと比べ、体重と内臓脂肪は有意に減少した。高脂肪食の運動群の体温は普通食の非運動群と比べ有意に増加した。高脂肪食の非運動群の血中血糖値、インスリン、コレステロール、トリグリセリド濃度は普通食群と比べ有意に増加し、高脂肪食の非運動群の血中インスリン、コレステロール濃度は運動群と比べ有意に増加した。高脂肪食の非運動群の血中アディポネクチンと nesfatin-1 濃度は普通食の非運動群と比べ有意に低下したが、高脂肪食の運動群の血中アディポネクチン、 nesfatin-1 と比べ有意差はなかった。

【結論及び考察】

これまでに、運動が体重、特に脂肪の蓄積と密接に関連していることが報告されてきた(Cox et al. 2010)。運動はエネルギーの消費量を増加させることで、肥満予防し、様々な疾病を予防する(MacLean et al. 2009)。

今回の実験で、運動が高脂肪食による体重増加を抑制することが分かった。高脂肪食により内臓脂肪は増加するが、運動により内臓脂肪の増加は抑制される。運動群の摂食量 (kcal) は非運動群の摂食量より有意に増加した。これは運動により、エネルギー摂取量の必要性が増加したと考えられる。

これまでに、アディポネクチンはインスリン感受性や血糖の調節、血管障害に対する修復や動脈硬化抑制に作用していることが示されている(Qi et al. 2004)。最近アディポネクチンはAMPK(AMP-activated protein kinase)を骨格筋及び肝臓において活性化することにより脂肪の燃焼と糖の取り込みを促進しインスリン抵抗性を改善することが示されている (Hattori et al. 2008)。この実験において、高脂肪食群の血中アディポネクチン濃度はコントロール群と比較し、有意に低下した。また、運動群の血中アディポネクチン濃度は高脂肪食群と普通食群と比較して、有意差を認めなかった。

これまでに、運動と高脂肪食が与える nesfatin-1 への影響についての報告はない。本研究では、高脂肪食の非運動群の血中 nesfatin-1 濃度はコントロール群と比較し、有意に減少した。更に、高脂肪食下における運動はこの有意な減少を抑制した。最近、2型糖尿病患者の空腹時の血中 nesfatin-1 濃度は健常者と比べ有意に低いことが報告されている。また、Suらは、nesfatin-1 の静脈内投与により、高血糖の db/db マウスの血糖値が減少したと報告している(Su et al. 2010)。また、nesfatin-1 免疫反応は、ヒトとラットの膵島β細胞で検出されることが報告されている(Foo et al. 2010)。従って、nesfatin は糖尿病や肥満などの生活習慣病と関係していることが示唆される。

結論として、高脂肪食は血中のアディポネクチン、 nesfatin を減少させ、運動により減少が抑制されることが示された。従って、生活習慣病の発症進展においては、食事だけでなく運動も重要であることが明らかになった。

(Experimental and Therapeutic Medicine. in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 125 号	学位申請者	呼 和 朝 魯
審査委員	主 査	堂 地 勉	学 位
	副 査	宮 田 篤 郎	副 査
	副 査	郡 山 千 早	副 査
<p>Effect of exercise and high-fat diet on plasma adiponectin and nesfatin levels in mice 運動と高脂肪食のマウスの血中アディポネクチンとネスファチンに対する影響</p> <p>近年、肥満、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病が増加する中、その発症メカニズムの解明とともに、効果的な食事療法や運動療法の研究は、世界中で注目されている。これまでの研究で、ghrelin、leptin、adiponectin などのペプチドが、生活習慣病の病態に関与していることが明らかにされてきた。adiponectin の作用としては、血糖値やインスリン感受性の調節作用、抗炎症作用、抗動脈硬化作用などが報告されている。一方、2006 年に脂肪組織から同定された nesfatin-1 は、nucleobindin-2(NUCB2) を前駆体とするペプチドであり、脂肪組織以外に視床下部、延髄、胃、膵島などに発現している。これまでの動物実験により、nesfatin-1 は摂食抑制系のペプチドであり、腸管運動に対する抑制効果も報告されている。しかし、高脂肪食負荷や運動が、血中 nesfatin-1 に与える影響については不明である。</p> <p>学位申請者は、高脂肪食負荷と運動負荷を用い、肥満に及ぼす運動の効果とその奏功機序の解析を試みた。普通食飼育の運動群と非運動群、高脂肪食飼育の運動群と非運動群の 4 群のマウスにおいて、摂食行動、体脂肪蓄積や血中代謝産物に加え、adiponectin、nesfatin 濃度を比較検討した。運動は自発運動とし、強制運動負荷は行わなかった。</p> <p>非運動群では adiponectin 濃度に加え、血中 nesfatin 濃度も体重の増加量や血中脂質、脂肪量と有意の負の相関を示すことが明らかとなった。4 週間の高脂肪食飼育群は普通食群に比し、摂食量 (Kcal)、体重、直腸温、腸間膜脂肪量、傍精巣上体脂肪量、血糖値、インスリン、トリグリセリド、コレステロールレベルが上昇し、血中 adiponectin、nesfatin-1 濃度は低下した。高脂肪食飼育下における運動群は、非運動群に比べて摂食量は増加したが、体重増加は著しく抑制され、腸間膜脂肪量、傍精巣上体脂肪量と血中インスリン、コレステロール濃度も改善した。両群で運動負荷量の相違は認められなかった。高脂肪食の非運動群と運動群の血中 adiponectin 濃度は不変であったが、nesfatin-1 濃度は運動により上昇し、脂肪重量当たりの nesfatin-1 濃度は adiponectin と共に、有意の増加が認められた。血中 nesfatin-1 濃度は、体重増加量とも逆相関する傾向が認められた。</p> <p>学位申請者の研究により、nesfatin-1 は体脂肪蓄積を反映するマーカーであり、摂食行動のみならず、糖、脂質代謝に関わっている可能性が考えられた。高脂肪食の負荷により nesfatin-1 の濃度は低下したが、運動により改善される傾向を示し、さらに腸間膜脂肪あたりの nesfatin-1 濃度の有意な改善を認められ、nesfatin-1 はさらに、高脂肪食負荷時の運動の効用に関与し、効果的な運動療法開発の指標になりうる可能性が考えられた。以上の知見は、nesfatin-1 を初めとする消化管ホルモンが、生活習慣病の病態のみならず、治療とも密接に関わることを明らかにした有意義な研究と考えられる。</p> <p>よって本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。</p>			

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 125 号	学位申請者	呼 和 朝 魯
審査委員	主 査	堂地 勉	学 位
	副 査	宮田 篤郎	副 査
	副 査	郡山 千早	副 査
			博士 (医学)
			岸田 昭世
			武田 泰生

主査および副査の5名は、平成23年3月7日、学位申請者 呼和朝魯 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) nesfatin-1は何処に存在するか。

(回答) 視床下部、脳幹、腸管、胎盤、脂肪組織などに存在している。

質問2) nesfatin-1は消化管にも発現しているが、消化管にも nesfatin-1 の受容体があるか。

(回答) nesfatin-1 の消化管機能に及ぼす作用などから、その受容体は消化管にも存在すると考えられるが、未だクローニングされていない。ただし、nesfatin-1 は視床下部の室傍核に存在する MC4R (メラノコルチン4受容体) を介して摂食抑制作用を果たしている。

質問3) 摂食後、血中の nesfatin-1 濃度は変化するか。nesfatin-1 を分泌する一番の要因は何か。

(回答) nesfatin-1 の血中濃度やその分泌機構に関しては、測定系により認識される nesfatin の分子型の相違も含め、十分な基礎検討が必要である。現在のところ、絶食により血中 nesfatin-1 濃度は低下し、摂食後に増加するという分泌動態を取り、摂食刺激が最も重要であろうと考えられている。

質問4) MC4R (メラノコルチン4受容体) は何処にあるか。

(回答) MC4R (メラノコルチン4受容体) は視床下部の室傍核と脳幹にも分布する。

質問5) なぜ高脂肪食で、nesfatin-1 の分泌は抑制されるか。

(回答) 本研究においては、高脂肪食そのものより、生じた肥満病態と nesfatin-1 分泌の関係が示唆され、肥満者においても血中 nesfatin-1 濃度は BMI と逆相関し、低下すると報告されている (Li QC et al, Regul Pept 2010)。高脂肪食により生じた体脂肪蓄積が、nesfatin 分泌を負に制御するとも考えられるが、その機序はなお明らかではない。

質問6) なぜ運動は高脂肪食下で nesfatin-1 を増加させ、普通食群では効果がみられなかったのか。

(回答) 運動の効果は、普通食群よりも高脂肪食群で効果が著名であった。この差は、運動量や摂食量の差に基づくものではなかった。両群における直腸温の差は特徴的であり、高脂肪食群では運動により、より大きなエネルギー消費がもたらされたものと考えられる。高脂肪食下の交感神経系の活性化に加え、運動によるインスリン抵抗性や代謝異常の是正により、nesfatin-1 分泌が回復したと考えられる。

質問7) 高脂肪食により、adiponectin、nesfatin-1 濃度は変化するが、nesfatin-1 の血中濃度の調節部位はどこか。

(回答) 血中 nesfatin-1 濃度は、摂食やストレスによる変動が示唆されている。nesfatin-1 は血中や肝、腎などで代謝され、代謝速度も nesfatin-1 の血中濃度を規定する因子となると考えられる。また肥満や痩せにおける変動も報告され、体脂肪蓄積状況が nesfatin-1 の血中濃度に何らかの影響を及ぼすと考えられるが、詳細は不明である。

質問8) nesfatin-1 の摂食調節作用は leptin と比べ、どの程度強いのか。

(回答) nesfatin-1 は強力な食欲抑制ペプチドであり、その作用は少なくとも投与実験で見える限り、leptin よりはるかに

最終試験の結果の要旨

強力である。

質問 9) nesfatin-1 の発現分泌が一番多い部位は何か。

(回答) nesfatin-1 の発現は、視床下部、延髄、弓状核、視床下部の外側野、脊椎の中縫核、孤束核、杏仁核、伏隔核、小脳、脂肪、胃、腸などであり、脳と消化管、脂肪組織に多く発現している。胃での発現は、脳より多いと報告されている。

質問 10) 各グループは 6 匹だが、それぞれ別のケージに飼育したか。

(回答) 各グループの 6 匹を個別に飼育した。

質問 11) 高脂肪食により、体重が増加し、太って動きにくいと考えられるが、高脂肪食の方が運動距離が長い原因は何か。

(回答) 高脂肪食群の走行距離は普通食群と比べ上昇傾向にあったが、有意差は認められていない。

質問 12) 今回は自発的な運動の測定であるが、もし、強制運動を行ったら、結果はどうなるか。運動パターンを見たか。

(回答) ビデオでの観察以外に、運動パターンの詳細な解析は行っていない。種々の程度の強制運動群の設定は、本研究結果をもとに、行ってみたいと考えている。

質問 13) 運動後、なぜ体温が上がったか。

(回答) 本研究の観察期間である 1 カ月では、筋肉量に有意の差は認められなかったが、運動により交感神経系が優位になり、褐色脂肪組織や筋肉での熱産生が亢進し、直腸温が上昇したと考えられる。高脂肪食負荷群では体温上昇は認められていないが、高脂肪食による食餌性産熱増加も、運動群の体温上昇の間接的要因とも考えられる。

質問 14) なぜ腸間膜脂肪量と傍精巣上体脂肪量の 2 つの脂肪量を測定したか。

(回答) マウスで秤量しうる脂肪量としてこの 2 つの脂肪組織を用いることが多い。

質問 15) 皮下脂肪は測定しなかったか。

(回答) 皮下脂肪量は操作上、やや定量性に欠けるため、本研究では測定しなかった。

質問 16) 運動により体重や血糖値などが下がるのは、本当に adiponectin や nesfatin-1 を介したことを示すデータがあるか。adiponectin と nesfatin-1 の分泌量は、運動の作用との因果関係を本当に証明出来るか。

(回答) 本研究は、内因性の adiponectin と nesfatin-1 の代謝パラメーターや運動効果との相関を解析した研究で、直接、間接の関わりを示し、ヒトでもその解析に多用される方法論である。直接の因果関係は、抗体投与実験やノックアウトマウス作製等を通じ、さらに検討を加える必要がある。

質問 17) 何で検定を行ったか。統計学的に用いたのは正規分布か、非正規分布どちらか。

(回答) 統計解析は、一元配置分散分析を用いて、その後多重比較のボンフェローニのテストを用いた。統計学的に非正規分布を用いた。

質問 18) adiponectin の分泌は皮下脂肪と内臓脂肪のどちらが多いか。

(回答) adiponectin の分泌量は皮下脂肪より内臓脂肪の方が多いと報告されているが、皮下脂肪量が圧倒的に多いことから、血中濃度は皮下脂肪に由来する adiponectin が主であると考えられる。

質問 19) 腸間膜脂肪量と傍精巣上体脂肪量はどちらが多いか。

(回答) 傍精巣上体脂肪量が腸間膜脂肪量より多いようである。

質問 20) ピアソンの相関係数は $r = -0.589$ だが、何故有意差は無かったか。 $n = 6$ は検定数として充分か。

(回答) 有意差が無かった原因として、実験に用いたマウスの数が少なかったことが考えられる。運動ケージが n 数の律速段階になってしまったが、次回は運動強度も考慮し、nesfatin-1 濃度から見た至適な運動の設定を行いたいと考えている。

質問 21) 摂食抑制系のペプチドと摂食促進系のペプチドでは、どちらが多いのか。

(回答) 摂食抑制系のペプチドの方が摂食促進系のペプチドより圧倒的に数が多い。摂食促進ペプチドは 10 以内である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。