

氏名	黒坂 裕香 Yuka kurosaka
所属	総合生活専攻 Graduate School of Human Ecology
学位の種類	博士 (学術)
学位記番号	甲第8号
学位授与年月日	2015年9月20日
学位授与の条件	学位規則第4条1項該当
学位論文題目	運動習慣と食事条件による脂肪肝予防メカニズムの検討 Study of fatty liver prevention mechanism by dietary conditions and exercise habits
論文審査委員	主査 金子 健彦 (和洋女子大学 教授) 副査 柳澤 幸江 (和洋女子大学 教授)、鬘谷 要 (和洋女子大学 教授) 小林 修平 (人間総合科学大学 非常勤理事)、山内 秀樹 (東京慈恵会医科大学 講師)

要旨

本研究の目的は、運動習慣と食事制限による脂肪肝予防メカニズムを検討することであった。成長期 Zucker Fatty ラット (遺伝性肥満ラット) を用いて、「食餌制限単独」と「食餌制限と運動の併用」によって体重の増加を抑制した場合の肝脂肪蓄積予防効果を検討し、そのメカニズムについて、①肝への脂肪酸の取り込み②肝脂肪酸β酸化③デノボ脂肪酸合成④脂肪細胞サイズとの関連⑤脂肪組織の脂肪分解能に着目して検討を行った。

本研究の主な知見は、食餌制限単独あるいは食餌制限と運動の併用により体重の増加を同じ程度抑制した場合、その体重抑制方法の違いによって肝脂肪蓄積への影響が大きく異なった点である。本研究において、Zucker Fatty ラットに対する食餌制限単独の実施は、体重の増加を抑制するものの、肝脂肪蓄積の抑制効果が観察されなかった。一方、食餌制限と運動を併用することにより、体重の増加の抑制と共に、顕著な肝脂肪蓄積の抑制が観察された。さらに、そのメカニズムについて、食餌制限単独の実施により確認された肝脂肪蓄積の亢進は、脂肪組織の脂肪分解反応に依存して増加した血中遊離脂肪酸が、肝 FAT/CD36 の働きによって効率よく肝中に取り込まれた結果である可能性が示唆された。また、食餌制限と運動を併用したことで確認された肝脂肪蓄積の抑制は、運動による脂肪組織の脂肪分解反応の減弱と血中遊離脂肪酸の抑制、肝β酸化の亢進が寄与した可能性が示唆された。

したがって、体重の増加を同様に抑制した場合でも、食餌制限単独と食餌制限と運動の併用した場合では、肝への遊離脂肪酸の取り込みや脂肪酸β酸化の違いを介して肝脂肪蓄積が異なることが明らかとなった。この結果は、脂肪肝の予防には、体重の増加を抑制するだけでなく、運動習慣を有することが重要であること示す科学的根拠となり得ると考えられた。

キーワード

肝脂肪蓄積 運動 食事制限 肥満 Zucker Fatty ラット

Abstract

This study investigated the mechanism by which habitual exercise and dietary restriction prevent fatty liver. The original study goal was to directly compare the effects of dietary restriction alone versus a combination of dietary restriction plus exercise on fatty liver disease using a Zucker fatty (ZF) rat matching-weight model.

The hepatic triglyceride levels were significantly lower with the combination treatment than with dietary restriction alone. To examine the mechanism, I focused on the free fatty acid (FFA) uptake into the liver, hepatic fatty acid oxidation, hepatic *de novo* fatty acid synthesis, adipocyte size in the fat pad, and adipose tissue lipolysis. The parameters associated with FFA uptake into the liver (serum FFA level and hepatic FAT/CD36 protein expression level) were lower in the combination treatment than with diet restriction only. The parameters associated with hepatic fatty acid oxidation (hepatic COXIV and CPT1A protein expression) were higher with the

combined treatment, while the parameters associated with adipose tissue lipolysis (adipose ATGL and MAGL protein expression) and adipocyte hypertrophy were higher with dietary restriction only. These results suggest that dietary restriction and habitual exercise regulate hepatic fat accumulation via hepatic FFA uptake and hepatic fatty acid oxidation. Habitual exercise plays an important role in decreasing hepatic fat accumulation.

In conclusion, this study investigated the different effects of dietary restriction only versus a combination of dietary restriction plus exercise in ZF rats with the same body weights. Exercise plays an important role in preventing the development of fatty liver.

Key words

Hepatic fat accumulation, Exercise, Dietary restriction, Obesity, Zucker fatty rat

第1章 緒言

近年、世界各国において、肥満人口は増加を続けており、大きな社会問題となっている。肥満の増加の背景には、運動不足や過食といったライフスタイルの変化が体内のエネルギー過剰状態を引き起こしている場合が多い。このエネルギー過剰状態を改善する方法として、一般的に、身体活動量の増加に伴うエネルギー消費量の増大や、食事由来のエネルギー摂取量の制限が挙げられる。どちらの方法を選択しても、エネルギー収支のバランスを整え、肥満を解消することが可能であると思われるが、運動不足状態では必ずしも健康的な肥満の解消にはつながらないことが過去の大規模なコホート研究等からも指摘されている。

また、近年、外観的な肥満の進行度だけでなく、脂肪の蓄積する部位によって健康障害が異なることが指摘されるようになり、非脂肪組織（肝、膵、心臓、骨格筋など）への脂肪沈着（異所性脂肪蓄積）が生活習慣病リスクを高める因子として注目されている。非肥満者であっても異所性脂肪蓄積が観察されるケースが存在し、生活習慣病リスクの1つとなる。そのため、適切な体重の維持と同時に肝への脂肪蓄積を回避することが、生活習慣病予防に有効であると考えられる。これらのことから、異所性脂肪蓄積に着目した生活習慣病の予防・改善方法に関する研究の蓄積が求められている。異所性脂肪蓄積の一つとして挙げられる肝脂肪蓄積の増加は、全身の代謝異常を引き起こし、非アルコール性脂肪肝、肝硬変、肝がんなどの疾患へと発展する。しかしながら、肥満を抑制するだけでなく、肝脂肪蓄積を抑制するための手段に関する研究は乏しい。そこで、適性体重の維持と同時に、肝脂肪蓄積を回避するために必要な生活習慣の改善点に関して、その基礎となる研究の蓄積が必要であると考えられた。

本研究で使用した Zucker Fatty (ZF) ラットは、遺伝的に肥満を発症する研究用の肥満モデル動物として広く用いられており、顕著な脂肪肝が生じる。先行研究では、肝脂肪蓄積に対する運動と食餌制限の影響について、ZF ラットを用いた比較・検討が行われていない。運動と食餌制限は共通して体重の増加を抑制する手段であるが、体重の増加を抑制する手段の違いにより肝脂肪蓄積抑制効果に違いがあるのかどうかは現在のところ不明である。そこで、本研究では、ZF ラットを用い、食餌制限単独と食餌制限に運動を併用した場合の影響の違いについて、体重が一致した条件で比較し、食餌制限と運動実施が肝脂肪蓄積に及ぼす影響、および、その作用メカニズムを検討することを目的とした。

第2-1章 運動習慣と食餌制限が肝脂肪蓄積に及ぼす影響

第1節 目的

これまでにも、肥満に対する運動の効果や食餌制限の効果に対する研究成果は数多く報告されてきた。ヒトを対象とした研究では、すでに肥満を発症している対象者に対する改善効果の検討が多く、肥満が発症していく過程における予防効果に着目した研究は乏しい。また、実験動物を対象とした研究では、食餌制限の効果と運動の効果に対して様々なメカニズムが明らかにされているものの、運動の効果と食餌制限の効果の違いを比較した研究は限られており、特に肝臓内の脂肪蓄積に着目した研究は少ない。

そこで、本章では、運動習慣と食餌制限が肝脂肪蓄積に及ぼす影響の違いについて ZF ラットを用いて検

討することを目的とした。

第2節 方法

実験は、和洋女子大学動物を対象とする研究に関する倫理委員会により審査され承認を得て実施した(和洋女子大学動物を対象とする実験研究に関する倫理委員会規定 第1015号)。

実験動物は、5週齢の雄性 Zucker Lean (ZL) ラットおよびZF ラットを用い、供給後、1週間の適応期間において実験を開始した。ZL ラットを対象群とし、ZF ラットは各群平均体重が一致するように、肥満群 (Obese ; Ob, 飽食条件にて通常飼育)、食餌制限群 (Dietary Restricted ; DR, Ob 群の70%の摂餌量で飼育)、食餌制限+運動群 (Dietary Restricted + Exercise ; DR+Ex, 自発走運動可能な加荷式回転自発運動量測定装置内で飼育し、かつ、DR 群と体重が一致するよう制限給餌,) に群分けした。飼料は、げっ歯目動物用固形飼料 (NMF : オリエンタル酵母工業) を用い、飲料水は全ての群において、水道水の自由摂取とした。体重、摂餌量、走行距離の計測は毎日同時刻に行った。全てのラットは、6週間の飼育期間終了時 (12週齢時) にイソフルランを用いた全身麻酔下で後大静脈より血液を採取し、心臓を摘出することにより安楽死させた。直ちに摘出した肝臓、精巣上体周囲脂肪、下腿骨格筋は、湿重量を測定後、分析まで -80°C で保存した。採取した血液は、血清を得た後、組織と同様に凍結保存した。

血中分析は、市販の測定キットを用いて行った。血中のトリグリセライド (TG) 濃度、遊離脂肪酸 (FFA) 濃度、レプチン濃度、インスリン濃度、総コレステロール (TCHO) 濃度、高比重リポタンパクコレステロール (HDL) 濃度、グルコース濃度、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) 値、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT) 値を測定し、得られたグルコース濃度とインスリン濃度より、Homeostasis model assessment ratio, homeostasis model assessment as an index of insulin resistance (HOMA-IR) の値を算出した。

肝中脂肪含有量は、Folch らの方法に従い、肝組織中の脂質抽出を行い、得られた抽出液中の TG を市販の測定キットで定量し、肝組織 1g あたりの含有量として算出した。

肝組織のパラフィン切片の作成および HE 染色は、肝組織を 20%ホルマリン液で固定後、株式会社エスアールエルに委託した。組織像は、光学顕微鏡 (Microphot-FX, ニコン) を用いて定性的な観察を行い、顕微鏡にセットしたデジタルカメラによって対物レンズ 40 倍で撮影した。

すべての結果は、群ごとに平均値 \pm 標準誤差で示した。群間の平均値の差の検定には、一元配置の分散分析を用い、有意な F 値が検出された場合には、群間の差を検定するために、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。いずれも、有意水準は $P<0.05$ とした。

第3節 結果

実験期間中の体重の変動について、Ob 群の体重は著しい増加を示したのに対し、DR 群、DR+Ex 群の体重は緩やかな増加であった。最終体重において L 群と比較して Ob 群 ($P<0.001$)、DR 群 ($P<0.05$)、DR+Ex 群 ($P<0.05$) の体重は有意に高値を示し、DR 群と DR+Ex 群は Ob 群と比較して有意に低値を示した ($P<0.001$)。なお、DR 群と DR+Ex 群の間に有意差がないことが確認された。

1日当たりの摂餌量は、L 群に比較し Ob 群、DR 群、DR+Ex 群で有意に多く ($P<0.001$)、Ob 群に比較して DR 群と DR+Ex 群は食餌制限を行ったことにより有意に少量であった ($P<0.001$)。また、DR 群と DR+Ex 群の食餌制限量は、それぞれ Ob 群の摂餌量の 71.18%と 71.38%であり、結果的に DR 群と DR+Ex 群の摂餌量に有意差は認められなかった。

DR+Ex 群の平均走行距離は、1日あたり $2553 \pm 425\text{m}$ であった。

解剖時の組織の組織湿重量の比較を行った。体重あたりの肝湿重量は、L 群に比較し Ob 群 ($P<0.001$) と DR 群 ($P<0.05$) は有意に高値を示し、Ob 群と比較し DR+Ex 群は有意に低値を示した ($P<0.01$)。体

重あたりの精巢上体周囲脂肪組織の湿重量は、L群に比較し、Ob群、DR群、DR+Ex群で有意に高値を示した ($P<0.001$)。体重あたりのヒラメ筋湿重量は、L群に比較しOb群、DR群、DR+Ex群で有意に低値を示し ($P<0.001$)、Ob群とDR群に比較しDR+Ex群は有意に高値を示した ($P<0.001$)。

血中分析結果の比較を行った。血中TG濃度は、L群に比較し、Ob群 ($P<0.001$) とDR ($P<0.01$) 群で有意に高値を示した。血中TCHO濃度は、L群に比較し、Ob群 ($P<0.001$) とDR群 ($P<0.001$) で有意に高値を示し、DR+Ex群はOb群 ($P<0.05$) とDR群 ($P<0.001$) に比較し有意に低値を示した。血中HDL-C濃度は、L群に比較し、Ob群 ($P<0.001$) とDR群 ($P<0.001$) で有意に高値を示した。また、Ob群に比較し、DR群は有意に高値を ($P<0.05$)、DR+Ex群は有意に低値を示し ($P<0.05$)、DR群に比較し、DR+Ex群は有意に低値を示した ($P<0.001$)。血中グルコース濃度は、L群に比較し、Ob群で有意に高値を示した ($P<0.001$)。また、Ob群に比較し、DR群 ($P<0.05$) とDR+Ex群 ($P<0.01$) で有意に低値を示した (図6, D)。血中インスリン濃度は、L群に比較し、Ob群 ($P<0.001$)、DR群 ($P<0.001$)、DR+Ex群 ($P<0.05$) で有意に高値を示した。HOMA-IRは、L群に比較し、Ob群、DR群で有意に高値を示した ($P<0.001$)。また、Ob群に比較し、DR+Ex群は有意に低値を示した ($P<0.001$)。

血中FFA濃度は、L群に比較し、Ob群とDR群で有意に高値を示し ($P<0.001$)、DR群に比較し、DR+Ex群で有意に低値を示した ($P<0.05$)。血中レプチン濃度は、L群に比較し、Ob群、DR群、DR+Ex群で有意に高値を示し ($P<0.001$)、DR+Ex群は、Ob群とDR群に比較し、有意に低値を示した ($P<0.001$)

血中AST値は、L群に比較しDR群が有意に高値を示した ($P<0.05$)。血中ALT値はLに比較し、DR群が有意に高値を示し ($P<0.05$)、DR群に比較しDR+Ex群が有意に低値を示した ($P<0.05$)。

肝脂肪蓄積の検討については、組織学的検討と生化学的な検討を行った。HE染色を行った肝組織の光学顕微鏡像観察において、L群の肝実質細胞には、ほとんど脂肪滴は観察されなかった。Ob群は、肝実質細胞内に泡沫状の脂肪滴が多く観察され、DR群で脂肪滴の蓄積が改善している様子は観察されなかった。DR+Ex群は、Ob群やDR群に比較すると観察される脂肪滴は少なく、肝への脂肪蓄積が改善している様子が観察された。肝TG含有量は、L群に比較し、Ob群、DR群で有意に高値を示した ($P<0.001$)。また、Ob群に比較し、DR群で有意に高値を示し ($P<0.05$)、DR+Ex群で有意に低値を示した ($P<0.05$)。さらに、DR群に比較し、DR+Ex群は有意に低値を示した ($P<0.001$)。

第4節 考察

本研究では、ZFラットを用いて、食餌制限単独あるいは食餌制限と運動の併用による肝脂肪蓄積への影響を検討した。本実験モデルの特徴は、食餌制限群と食餌制限+運動群を等しい体重において比較した点である。この両群の比較における主要な結果は、食餌制限群では肝脂肪蓄積の抑制効果が認められなかったが、食餌制限+運動群では肝脂肪蓄積の抑制効果が認められたことである。加えて、肥満群で高値であった血中AST、ALT値は、食餌制限群でも高値を維持しており、その一方で食餌制限+運動群では低値であった。このことから、肥満群と食餌制限群では肝脂肪蓄積と肝機能障害が進行していることが確認され、習慣的な運動はそれらを抑制する効果があることが明らかとなった。食餌制限群と食餌制限+運動群が、同じ体重であっても、肝脂肪蓄積に対して異なる結果を示したことは、単に体重の増加を抑制するだけでなく、体重のコントロール手段の選択が重要であることを指摘する根拠となりうると考えられた。

第2-2章 運動と食餌制限による肝脂肪蓄積予防メカニズムの解明—肝組織脂質代謝機構の検討—

第1節 目的

第2-1章において、ZFラットにおける運動と食餌制限の肝脂肪蓄積への影響を明らかにした。しかしながら、そのメカニズムに関しては明らかではない。肝への脂肪蓄積は、肝へのFFAの取り込みの増加、TGの分解および脂肪酸 β 酸化の低下、脂肪酸デノボ合成系およびTG合成系の亢進が複合的に生じることによって進行する。本章では、これらの点に着目し、肝組織における分子生物学的な分析を行うことによ

ってそのメカニズムを検討することを目的とした。

第2節 方法

肝組織の分子生物学的分析は、第2-1章でラットより摘出した肝組織を用い、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法で行った。

サンプルの調整は次の手順で行った。肝組織の血液や結合組織を氷上で除去し、ディスポメスと鋏で裁断した後、肝湿重量 1mg あたり 7 μ l の氷上で冷却したホモジネートバッファーを加え、トリポロンホモジナイザーを用いてホモジネートした。一度、凍結融解処理を行った後に 4°C、10000 \times g で 20 分間遠心分離し、その上清を得た。上清は、ウシ γ グロブリンをスタンダードとして Protein Assay (BioRad) を用いてタンパク質濃度の定量を行った。タンパク質濃度が決定した上清サンプルにホモジネートバッファーを加えることで、サンプル間でタンパク質濃度が等しくなるよう調製し、2 倍濃縮サンプルバッファー (125mM Tris, 10%SDS, 30%グリセロール, 0.1% BPB) で 1:1 に希釈した。調製したサンプルをドライブロックバスで 90°C 10 分間加熱し、タンパク質を変性させた。

それぞれのタンパク質を分離するために、SDS アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を行った。一定量のタンパク質を含むようサンプルをゲルにロードし、電気泳動装置 (パワーパック HC, BioRad) を用いて 150V 定電圧下で 60 分間電気泳動した後、ニトロセルロースメンブレンに 100V 定電圧下で 60 分転写した。タンパク質を転写後、メンブレンを T-TBS (25mM Tris, 137mM NaCl, 0.1% Tween-20) で 5 分 \times 3 回洗浄し、5%スキムミルク含有 T-TBS 内にて 1 時間ブロッキングした。再び、メンブレンを T-TBS で 5 分 \times 3 回洗浄し、FAT/CD36, COXIV, CPT1A, ATP-CL, FAS, DGAT2 を標的として、それぞれのタンパク質に特異的に反応する 1 次抗体を用いて、4°C で 16 時間インキュベートした。1 次抗体は、それぞれの条件に適切な濃度になるよう 5%スキムミルクまたは 5%BSA 含有 T-TBS で希釈して使用した。その後、メンブレンを T-TBS で 5 分 \times 3 回洗浄し、5%スキムミルク含有 T-TBS で希釈した 2 次抗体を用いて室温で 1 時間インキュベートした。メンブレンを T-TBS で 5 分 \times 3 回洗浄し、発光検出試薬に反応させ、CCD イメージャー (ImageQuant LAS 4000, GE ヘルスケア) でバンドを検出し、デジタル画像としてコンピュータに取り込んだ。各バンドの定量は、イメージ解析ソフトウェア (ImageQuant TL, GE ヘルスケア) にて行った。SDS-PAGE およびウエスタンブロット分析は、各項目 3 回以上行い、L 群を 100 とした時の相対値で示した。

肝の脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性の測定は、肝組織を Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) でホモジナイズ後、105,000 \times g で 1 時間遠心分離した上清を酵素液とて、Nepokroeff らの方法に従っておこなった。活性の測定は、酵素液を加えた反応液 (0.1M リン酸カリウム緩衝液, 0.2mM EDTA, 0.3mM NADPH, 0.05mM アセチル CoA) に 0.2mM マロニル CoA を加えることによる NADPH の減少速度を 340nm の吸光度の減少により求めた。分子吸光係数 6.22 \times 10³ から NADPH の減少量を求め、各サンプルのタンパク質濃度で標準化した値を得た。

すべての結果は、群ごとに平均値 \pm 標準誤差で示した。群間の平均値の差の検定には、一元配置の分散分析を用い、有意な F 値が検出された場合には、群間の差を検定するために、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。いずれも、有意水準は P<0.05 とした。

第3節 結果

肝組織中の FAT/CD36 の相対的タンパク質発現量は、L 群に比較し Ob 群 (P<0.05), DR 群 (P<0.001), DR+Ex (P<0.01) 群で有意に高値を示した。また、DR 群は Ob 群, DR+Ex 群に比較し、有意に高値を示した (P<0.001)。肝組織中の COXIV の相対的タンパク質発現量は、Ob 群と DR 群に比較し、DR+Ex 群で有意に高値を示した (P<0.05)。肝組織中の CPT1A の相対的タンパク質発現量は L 群, Ob 群に比較し、DR 群で低い傾向が認められ、DR 群に比較し、DR+Ex 群は有意に高値を示した (P<0.01)。肝組織

中の ATP-CL の相対的タンパク質発現量は、L 群に比較し DR 群で有意に高値を示した ($P<0.01$)。また、Ob 群と DR+Ex 群に比較しても、DR+Ex 群は高値を示す傾向があった。肝組織中の FAS の相対的タンパク質発現量は、L 群 ($P<0.01$) と Ob 群 ($P<0.05$) に比較し、DR+Ex 群で有意に高値を示した。肝組織中の DGAT2 の相対的タンパク質発現量は、群間に有意な差は認められなかった。

肝組織中の FAS 活性は、L 群に比較し Ob 群 ($P<0.01$) と DR 群 ($P<0.001$) で有意に高い値を示した。

第4節 考察

肝への脂肪蓄積は、①肝への FFA の取り込みの増加、②TG の分解および脂肪酸 β 酸化の低下、③脂肪酸デノボ合成系およびTG合成系の亢進が複合的に生じて起こる。運動と食餌制限が肝脂肪蓄積に及ぼした影響のメカニズムとして、これらの関連タンパク質発現の結果から、食餌制限群では肝への FFA の取り込みの増強と FAS 活性の亢進、脂肪酸 β 酸化の減弱が生じている可能性が示唆された。食餌制限+運動群では、ミトコンドリアの増加が示唆され、 β 酸化が亢進している可能性が示唆された。

第2-3章 運動と食餌制限による肝脂肪蓄積予防メカニズムの解明 —脂肪細胞サイズと脂肪分解能に着目した検討—

第1節 目的

第2-1章にて、ZF ラットの肝脂肪蓄積は、運動により抑制されるが、食餌制限のみでは抑制されなかったことを報告した。しかしながら、そのメカニズムに関しては十分な説明ができていない。先行研究により、脂肪細胞サイズの肥大は、肝臓をはじめとした他臓器への脂肪蓄積を誘導するが、小型の脂肪細胞の数が増加した場合には他臓器への脂肪蓄積は起こりにくいことが報告されている。本章では、肝脂肪蓄積に対する運動と食餌制限の影響について、脂肪組織を介したメカニズムについて検討した。

第2節 方法

脂肪組織の形態学的分析では、第2-1章でラットより摘出した、精巣上体周囲の脂肪組織を用いた。

脂肪組織のパラフィン切片の作成および HE 染色は、脂肪組織を 20%ホルマリン液で固定後、株式会社エスアールエルに委託した。組織像は、光学顕微鏡 (Microphot-FX ; ニコン) を用いて定性的な観察を行い、顕微鏡にセットしたデジタルカメラによって対物レンズ 40 倍で撮影した。

脂肪組織の細胞サイズの比較は、交点間距離法により行った。画像解析ソフト Image J software (version 1.46; National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) にて平行線を画像の上に重ね、平行線と細胞壁が交わる部分を交点としてその距離をソフトウェア上で各群 2000 本 ($n=3$) を計測した。

脂肪組織の分子生物学的分析は、第2-1章でラットより摘出した精巣上体周囲の脂肪組織を用い、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法で行った。サンプルの調整は次の手順で行った。脂肪組織の血液や結合組織を氷上で除去し、ディスポメスと鋏で裁断した後、脂肪組織湿重量 1mg あたり 4 μ l の氷上で冷却したホモジネートバッファーを加え、トリポロンホモジナイザーおよび超音波ホモジナイザーを用いてホモジネートした。一度、凍結融解処理を行った後に 4 $^{\circ}$ C、10000 \times g で 20 分間遠心分離し、その上清を得た。上清は、ウシグロブリンをスタンダードとして Protein Assay (BioRad) を用いてタンパク質濃度の定量を行った。タンパク質濃度が決定した上清サンプルに、ホモジネートバッファーを加えることで、サンプル間でタンパク質濃度が等しくなるよう調製し、2 倍濃縮サンプルバッファー (125mM Tris, 10%SDS, 30%グリセロール, 0.1% BPB) で 1 : 1 に希釈した。調製したサンプルをドライブロックバスで 90 $^{\circ}$ C 10 分間加熱し、タンパク質を変性させた。

それぞれのタンパク質を分離するために、SDS-PAGE を行った。一定量のタンパク質を含むようサンプルをゲルにロードし、150V 定電圧下で 60 分間電気泳動した後、ニトロセルロースメンブレンに 100V 定電圧下 60 分で転写した。タンパク質を転写後、メンブレンを T-TBS で 5 分 \times 3 回洗浄し、5%スキムミルク

ク含有 TTBS 内にて 1 時間ブロッキングした。再び、メンブレンを TTBS で 5 分×3 回洗浄し、アディポネクチン、ATGL、MAGL、p-HSL を標的として、それぞれのタンパク質に特異的に反応する 1 次抗体を用いて、4℃で 16 時間インキュベートした。1 次抗体は、それぞれの条件に適切な濃度になるよう 5% スキムミルク含有 TTBS で希釈して使用した。その後、メンブレンを TTBS で 5 分×3 回洗浄し、5% スキムミルク含有 TTBS で希釈した 2 次抗体を用いて室温で 1 時間インキュベートした。メンブレンを TTBS で 5 分×3 回洗浄し、発光検出試薬に反応させ、CCD イメージャーでバンドを検出し、デジタル画像としてコンピュータに取り込んだ。各バンドの定量は、イメージ解析ソフトウェアにて行った。SDS-PAGE およびウェスタンブロット分析は、各項目 3 回以上行い、平均値を代表値とし、L 群を 100 とした時の相対値で示した。

すべての結果は、群ごとに平均値±標準誤差で示した。群間の平均値の差の検定には、一元配置の分散分析を用い、有意な F 値が検出された場合には、群間の差を検定するために、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。いずれも、有意水準は $P<0.05$ とした。

第3節 結果

精巢上体脂肪組織の脂肪細胞のサイズの分布は、DR 群と DR+Ex 群の比較において、DR 群では大型の脂肪細胞が多く観察され、DR+Ex 群では、小型の脂肪細胞が多く観察された。各群の脂肪細胞の交点間距離の平均値を比較すると、L 群と比較して、Ob 群、DR 群、DR+Ex 群で肥大化が観察された ($P<0.001$)。また、DR+Ex 群は Ob 群、DR 群に比較し肥大化は抑制された ($P<0.001$)。

精巢上体脂肪組織のアディポネクチンのタンパク質発現量は、L 群に比較し、DR 群が有意に低値を示した ($P<0.05$)。ATGL のタンパク質発現量は、L 群に比較し、DR 群で有意に高値を示した ($P<0.01$)。また、DR 群に比較し、DR+Ex 群は有意に低値を示した ($P<0.05$)。p-HSL のタンパク質発現量は、群間に有意な差は認められなかった。MAGL のタンパク質発現量は、L 群に比較し、Ob 群と DR 群で有意に高値を示した ($P<0.01$)。

第4節 考察

本章では、ZF ラットに対する食餌制限や運動習慣が肝脂肪蓄積に及ぼした影響のメカニズム追究のために、脂肪組織の脂肪細胞サイズと脂肪分解能に着目にした分析を実施した。脂肪細胞サイズに着目した検討では、食餌制限群は、脂肪細胞の肥大化と過剰な肝脂肪蓄積が確認され、食餌制限+運動群では、運動習慣により脂肪細胞の肥大の抑制が確認された。脂肪細胞サイズの違いは、脂肪組織の性質的变化を引き起こすことがよく知られている。脂肪組織の脂肪分解能に関与するタンパク質発現を検討した結果、本研究の食餌制限群で確認された肝脂肪蓄積の亢進は、脂肪組織での脂肪酸分解反応の亢進に依存し増加した血中の FFA が、効率よく肝に取り込まれた結果である可能性が示唆された。また、食餌制限+運動群で確認された肝脂肪蓄積の抑制は、脂肪組織の脂肪分解反応の低下による血中 FFA の低下が生じたことが影響した可能性が示唆された。

第3章 総合考察

本研究の目的は、運動習慣と食事制限による脂肪肝予防メカニズムを検討することであった。食事制限や運動は、一般的によく用いられている体重コントロール方法であり、また、脂肪肝の予防や改善のためにも実施されている。これまでにも、食事制限または運動が肝脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した研究は多く存在するが、これらを同時に実施した研究は乏しい。特に、体重の増加が著しい ZF ラットの肝脂肪蓄積に対して、運動と食餌制限の効果を比較した研究は他に例がなく、本研究がはじめての報告である。

本研究の重要な知見は、食餌制限単独あるいは食餌制限と運動の併用により体重の増加を同じ程度抑制した場合、その体重抑制方法の違いによって肝脂肪蓄積への影響が大きく異なった点である。本研究において、ZF ラットに対する食餌制限単独の実施は、体重の増加を抑制したものの、肝脂肪蓄積の抑制効果は

認めなかった。一方、食餌制限と運動を併用したことにより、体重の増加の抑制と共に、顕著な肝脂肪蓄積の抑制が観察された。さらに、そのメカニズムについて、本研究の食餌制限群で確認された肝脂肪蓄積の亢進は、脂肪組織の脂肪分解反応に依存して増加した血中の FFA が、肝 FAT/CD36 の働きによって効率よく肝に取り込まれた結果である可能性が示唆された。また、食餌制限+運動群で確認された肝脂肪蓄積の抑制は、運動による脂肪組織の脂肪分解反応の減弱と血中 FFA の抑制、肝 β 酸化の亢進が寄与した可能性が示唆された。以上の結果から、同じレベルで体重の増加を抑制した場合でも、食餌制限単独と食餌制限と運動の併用では、肝への FFA の取り込みや脂肪酸 β 酸化への影響の違いを介して肝脂肪蓄積への影響が異なることが明らかとなった。

食餌制限群と食餌制限+運動群の比較で肝脂肪蓄積に明確な差が生じたことは、運動習慣が、食事制限のみでは得られない肝脂肪蓄積の抑制に必要な要素を担っていることを示している。この結果は、脂肪肝の予防には、体重の増加を抑制するだけでなく、運動習慣を有することが重要であること示す科学的根拠となり得ると考えられた。本研究では、肥満を回避できたとしても生活習慣によっては、肝脂肪蓄積をはじめとした生活習慣病リスクを低減できない可能性があることを指摘し、運動不足の状況では肝脂肪蓄積が生じ易い可能性があることを示した。今後、肝脂肪蓄積の抑制に有効な運動の条件を検討していくことが、本研究の結果をヒトに応用していくために必要な課題であると考えている。

第4章 結語

本研究は、ZF ラットに対し、食餌制限単独あるいは食餌制限と運動の併用により体重の増加を同じ程度抑制した場合、その体重抑制方法の違いによって肝脂肪蓄積への影響が異なることを明らかにした。食餌制限単独の実施により、肝脂肪蓄積は進行し、そのメカニズムとして、脂肪細胞の脂肪分解反応の亢進による血中 FFA の増加と、肝への FFA の取り込みの増加が関与していることが示唆された。一方、食餌制限と習慣的な運動の併用により、肝脂肪蓄積は抑制され、そのメカニズムとして、血中 FFA の抑制と肝への FFA の取り込みの抑制、肝の β 酸化の亢進が関与していることが示唆された。したがって、運動習慣には、食事制限のみでは得られない肝脂肪蓄積抑制効果があることが明らかとなった。本研究の結果は、体重のコントロールだけでなく、運動習慣を有することの重要性を示す科学的根拠として、成長期からの過食や運動不足、それによる肥満や脂肪肝の予防に応用できる可能性が考えられた。

本論文に関する業績（有審査原著論文）

- 1) 黒坂裕香, 北村裕美, 山内秀樹, 代谷陽子, 湊久美子, Zucker 肥満ラットの肝脂肪蓄積の抑制に対する運動習慣と食餌制限の効果, 体力科学, 63 (1), 223-229, 2014.
- 2) Yuka Kurosaka, Yoko Shiroya, Hideki Yamauchi, Takehiko Kaneko, Yoichiro Okubo, Kazutoshi Shibuya and Kumiko Minato, Effects of habitual exercise and dietary restriction on intrahepatic and periepididymal fat accumulation in Zucker fatty rats, BMC Research Notes, 8: 121 , 2015. DOI 10.1186/s13104-015-1063-6.