

和洋女子大学大学院

博士論文

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

指導教員 教授 湊 久美子

総合生活研究科 総合生活専攻

博士後期課程

1242202 黒坂 裕香

目次

第 1 章 緒言	1
第 1 節 我が国の健康施策上の課題	1
第 2 節 身体活動量と健康	2
第 3 節 異所性脂肪蓄積	4
第 4 節 肥満と脂肪肝	5
第 5 節 Zucker Fatty ラット	6
(1) Zucker Fatty ラットの特徴	6
(2) ZF ラットの肝	8
(3) ZF ラットと OLETF ラット	9
(4) ZF ラットの食餌制限に関する先行研究	10
(5) ZF ラットの活動量・運動に関する先行研究	11
第 6 節 本研究の目的	13
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	14
第 1 節 目的	14
第 2 節 方法	14
(1) 対象と群分け	14
(2) 飼育条件	15
(3) 試料採取	16
(4) 血中分析	17
(5) 肝組織中の脂質分析	17

(6) 肝組織の組織学的分析	18
(7) 統計処理.....	18
第3節 結果	18
(1) 実験期間中の体重変動	18
(2) 1日あたりの摂餌量, DR+Ex群の走行量	19
(3) 組織湿重量の比較.....	20
(4) 血中分析.....	21
1. 血中 TG, TCHO, HDL-C 濃度	21
2. 血中 FFA, レプチン濃度.....	23
3. 血中 AST, ALT 値	23
(5) 肝 TG 含有量と肝組織所見	24
第4節 考察	26
(1) 肝脂肪蓄積の抑制に対する運動と食餌制限の効果の違い	26
(2) OLETF の先行研究と比較して	28
(3) レプチン抵抗性と運動	30
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–	32
第1節 目的	32
第2節 方法	32
(1) 肝組織の分子生物学的分析.....	32
1. サンプル調製	32
2. SDS-PAGE およびウエスタンブロット法	33

(2) 脂肪酸酵素活性	34
(3) 統計処理.....	34
第3節 結果	34
(1) FAT/CD36.....	34
(2) COXIVとCPT1A	35
(3) ATP-CL, FAS, DGAT2.....	36
(4) FAS 活性	37
第4節 考察	37
(1) FFA とFAT/CD36	37
(2) COXIVおよびCPT1A.....	40
(3) ATP-CL, FAS, DGAT2.....	42
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—	45
第1節 目的	45
第2節 方法	45
(1) 脂肪組織の組織学的分析	45
(2) 脂肪組織の分子生物学的分析	46
1. サンプル調製	46
2. SDS-PAGE およびウエスタンブロット法	47
(3) 統計処理.....	48
第3節 結果	48
(1) 脂肪組織の形態学的分析	48

(2) アディポネクチン	51
(3) ATGL, p-HSL, MAGL	51
第4節 考察	52
(1) 肝脂肪蓄積と脂肪組織の脂肪細胞サイズ	53
(2) 脂肪組織の機能 脂肪組織の脂肪分解能	56
第3章 総合考察	60
第4章 結語	65
謝辞	66
引用文献	67

図一覧

図 1	実験動物	15
図 2	実験で使用したラットのケージ	16
図 3	体重の変化	19
図 4	1日あたりの餌の摂取量と DR+Ex 群の走行距離の推移	19
図 5	肝, 精巣上体周囲脂肪, ヒラメ筋湿重量	20
図 6	血中 TG, T-CHO, HDL-C, グルコース, インスリン濃度とインスリン抵抗性 ..	22
図 7	血中遊離脂肪酸とレプチン濃度	23
図 8	血中 AST と ALT 濃度	24
図 9	肝組織の光学顕微鏡所見 (ヘマトキシリンエオジン染色)	25
図 10	肝 TG 含有量	25
図 11	肝組織の FAT/CD36 相対的タンパク質発現量	35
図 12	肝組織の COXIV および CPT1A の相対的タンパク質発現量	35
図 13	肝組織の ATP-CL, FAS, DGAT2 の相対的タンパク質発現量	36
図 14	肝組織の FAS 活性	37
図 15	交点間距離法による脂肪細胞サイズの推定	46
図 16	精巣上体周囲脂肪組織の光学顕微鏡像 (ヘマトキシリン・エオジン染色) ..	48
図 17	精巣上体脂肪組織の脂肪細胞サイズの分布	49
図 18	DR 群と DR+Ex 群の脂肪細胞サイズの分布の比較	50
図 19	精巣上体脂肪組織の脂肪細胞サイズの平均	50
図 20	精巣上体脂肪組織アディポネクチンタンパク質発現量	51
図 21	精巣上体脂肪組織 ATGL, p-HSL, MAGL タンパク質発現量	52

表一覧

表 1	餌の組成	16
-----	------------	----

第1章 緒言

第1節 我が国の健康施策上の課題

欧米諸国をはじめとした、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。1980年から2013年までの世界人口に対する肥満と過体重の割合の推移をシステマチック分析によりまとめた報告では、Body Mass Index (BMI) 25以上の成人男性の割合は28.8%から36.9%、成人女性の割合は29.8%から38.0%に増加したことが報告された¹⁾。

我が国では、近年、肥満者の増加は横ばいの傾向にあるものの、過去30年間の肥満者の割合は、特に男性で増加傾向にあることが知られている²⁾。平成25年度の国民健康栄養調査³⁾の結果からも、肥満者 (BMI \geq 25) の割合は、男性28.6%、女性20.3%であることが報告された。肥満に至った経緯や背景は様々であり、遺伝的な要因が原因であるケースも存在するが、多くは、日常生活で調節可能な外的因子 (食生活や運動習慣など) によることが多い。

我が国では、2000年から健康づくり施策である「健康日本21」が進められ、2008年の改訂、2013年からの「健康日本21 (第2次)」の施行を経て、国民の健康推進に関する基本的方向性や目標が示されてきた⁴⁾。「健康日本21」では、適性体重の維持に関して、「児童、生徒の肥満の割合」、「20歳代女子のやせの割合」、「20～60歳代の男性肥満者の割合」などの目標値が設定され、取り組まれたが、これらの点に関しては最終評価時に、改善が見られなかったことが報告された (「児童、生徒の肥満の割合」：2000年策定時ベースライン値10.7%に対して目標値を7%に設定し、2009年最終評価で9.2%、「20歳代女子のやせの割合」：ベースライン値23.3%に対して目標値15%以下と設定され、最終評価で22.3%)。「20～60歳代の男性肥満者の割合」：ベースライン値の24.3%に対して目標値15%と設定され、最終評価で31.7%。)。同時に、身体活動・運動についての評価項目「日常生活における歩数の増加」に関して

も、「健康日本 21」で取り組まれたものの目標値には大きく及ばずベースライン値を下回る結果であった（「一日あたりの歩数」：ベースライン値男性 8202 歩，女性 7282 歩に対して目標値男性 9200 歩，女性 8300 歩と設定され，最終評価で男性 7243 歩，女性 6431 歩）。加えて，運動習慣のある者とない者で比較すると，一日の平均歩数に有意な差が認められたことが報告され，運動習慣の有無により，日常生活における歩数は二極化していることが明らかとされた。さらに，評価項目の「運動習慣者の増加」に関しては，性・年齢階級別にみると，60 歳代は有意に運動習慣のある者が増加したが，40～50 歳代女性では有意に減少するなどの違いが生じており，特に 20 歳から 60 歳までの若者や働き盛りの世代に対する運動啓発の必要性が指摘された。

これらの「健康日本 21」の最終評価を受け，平成 25 年からスタートした「健康日本 21（第 2 次）」においても，「適正体重を維持している者の増加」，「適切な量と質の食事をとる者の増加」，「日常生活における歩数の増加」，「運動習慣者の歩数の増加」などが引き続き目標項目として挙げられている。平成 25 年度の国民健康栄養調査の結果³⁾では，男性 20～60 歳代の肥満者の割合は 29.0%（健康日本 21 第 2 次の目標値 28%），20 代女子のやせの割合は 21.5%（目標値 20%），20～64 歳の運動習慣のある者の割合は男性 26.2%（目標値 36%）女性 23.1%（目標値 48%），1 日の歩数の平均値は男性 7099 歩，女性 6249 歩（目標値 20～64 歳男性 9000 歩，女性 8500 歩，65 歳以上男性 7000 歩，女性 6000 歩）と報告された。したがって，適正体重の維持や運動習慣・食生活の改善は，我が国の健康政策上の長年の課題となっている。

第 2 節 身体活動量と健康

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つながらないことが過去の研究報告から明らかとされている。

1989年に Blair ら⁵⁾は、大規模なコホート研究によって、肥満と身体活動量、死亡率の関係を追跡し、肥満であっても活発な日常生活を送っている者は、標準体型で運動不足の者よりも死亡率が低いことを報告した。また、Lee ら⁶⁾は、虚血性心疾患のリスクを低下させるために身体活動が重要であることを示し、体重管理のためには、食事コントロールに頼るだけでなく、運動を実施することの重要性を指摘した。このように、肥満度とは独立して、身体活動量（運動量）の増加が、健康状態の維持に不可欠であることが報告されてきた。

同様に、肥満や生活習慣病に対する食事や運動条件の介入研究からも、運動習慣の重要性を示す研究結果が複数報告されている⁷⁻¹⁰⁾。例えば Tamura ら⁸⁾は、2型糖尿病患者に対し、2週間の食事コントロール（60%炭水化物、25%脂肪および15%タンパク質、27.9キロカロリー/kg）と運動（5～6日/週の頻度で30分の運動を2～3セット）の介入を行い、食事コントロールのみの実施に比較し、食事コントロールと運動を併用した方が肝内脂肪や筋細胞内脂肪が減少し、骨格筋のインスリン誘導性糖取り込みが増加することを報告した。また、Larson-Meyer ら^{9, 10)}は、過体重の男女に対し、5週間のベースライン調査後に食事制限単独（ベースラインに対して25%制限食）と、食事制限と運動の併用（ベースラインに対して25%制限食とベースラインに対してエネルギー消費量12.5%増の運動の実施）の条件で6ヶ月間の介入研究を行った。結果として、食事制限単独条件と食事制限と運動の併用条件は両者ともに体脂肪の減少効果が確認され、その値に両群間に有意な差は認められなかった⁹⁾。一方、インスリン感受性の改善や、LDL コレステロールと拡張期血圧の低下は、食餌制限と運動を併用させたことによるのみ観察されたことが報告された¹⁰⁾。このよう

に、肥満や糖尿病の予防・改善には、食事コントロールのみでも一部の効果は認められるが、運動習慣を取り入れることでより効果的であることが示されている。

しかしながら、肥満や生活習慣病に対する食事コントロールと運動習慣の介入効果の違いについて、それぞれの作用メカニズムは、現在のところまだ十分に明らかにされていない。特に、運動の実施と食事制限を比較した基礎的研究は限られている。そこで、運動と食事条件の効果の違いについて、外観からは判断のできない組織レベル、細胞レベルにおいてどのような違いがあるのかを検討することが必要であると考えられた。

第3節 異所性脂肪蓄積

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ている^{7, 11-14)}。内臓脂肪蓄積は、皮下脂肪蓄積に比較してインスリン抵抗性が惹起されやすく、高血糖、脂質異常症、高血圧等のメタボリックシンドロームの要因となりうることが知られている⁷⁾。さらに、近年では、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。

Despres ら¹³⁾は、異所性脂肪蓄積は脂肪組織の機能不全により適切な脂肪蓄積が不可能となった結果であるという脂質代謝モデルを示し、肝、心臓、骨格筋などは脂肪蓄積部位として望ましくないことを説明した。その理由として、異所性脂肪蓄積は、内臓脂肪や皮下脂肪への脂肪蓄積と比較し、インスリン抵抗性を強く惹起し、また臓器の機能不全が生じるなど、生活習慣病との関連が強いことが指摘された¹³⁾。さらに、骨格筋内への脂肪蓄積に関しては、Goodpaster ら¹⁴⁾と Kelly ら¹²⁾が、インスリン抵抗性との関連を検討し、骨格筋内の脂肪蓄積の抑制は骨格筋内のエネルギー代謝を改善し、全身のインスリン抵抗性の改善に寄与することを報告した。また、肝脂肪蓄積に関しては、

Kotronen ら¹⁵⁾が、腹腔内脂肪蓄積と肝脂肪蓄積のメタボリックシンドローム構成因子としての貢献度について多変量線系回帰モデルを用いて検討した。その結果、肝脂肪蓄積は、血糖値の増加と肝酵素異常の独立した予測因子であることが報告された。このように、脂肪の蓄積箇所により健康障害のリスクは異なるため、一概に BMI を用いた肥満の程度の判定のみで、健康障害のリスクを判断することは難しいことが指摘されている。

我が国で 2008 年より導入された特定保健指導のスクリーニングでは、その第一段階として、腹囲（男性 85cm、女性 95cm）と BMI（25 以上）の判定基準が設けられており、この条件に当てはまらない者は対象者から除外される制度となっている¹⁶⁾。しかしながら、この制度の中では対象からは除外される非肥満者の中にも、疾病リスクを有する者は少なくなく、その対応の必要性が検討されている。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¹⁷⁾。したがって、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。

第 4 節 肥満と脂肪肝

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¹⁸⁻²⁰⁾。一般的に、脂肪肝の発症は肥満との合併が多いことが知られているが、一方で、非肥満者であっても脂肪肝が観察されるケースが存在し、肝機能異常やインスリン抵抗性などが生じることが知られている²¹⁾。例えば、過度な食事制限や低栄養状態では肝脂肪蓄積が誘発されることが知られており、タンパク質失調の病態であるクワシオルコルでは、低体重と共に、脂肪肝が観察される²²⁾。また、脂肪肝の罹患率については、人種による違いが指摘されており、アジア系の人種は、BMI が正常であっても脂肪肝の罹患率が高い遺伝的要素を持つと報告されている^{23,24)}。Azuma ら²³⁾は、非ヒスパニック系白人との比較に

において、日本人は BMI が低い者が多いにも関わらず、脂肪肝や脂質異常症、インスリン抵抗性を示す者が多いことを報告した。さらに、BMI 階層別に脂肪肝の有病率を比較した場合、日本人男性の標準体重に匹敵する BMI 23.5-25 の者のうち 33.3%が脂肪肝であったことを認めた²³⁾。これは、非アルコール性脂肪肝の発症リスクは、肥満や極度の低体重（栄養失調）に伴うものだけでなく、体重に依存しない発症要因が存在することを意味している。非肥満者でも観察される肝への過剰な脂肪蓄積は、肝機能の異常やインスリン抵抗性の促進により全身の糖・脂質代謝異常を介して更なる代謝疾患へとつながる²¹⁾。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。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。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。

第 5 節 Zucker Fatty ラット

(1) Zucker Fatty ラットの特徴

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いる²⁵⁾。1961年に Zucker ら^{26, 27)}は、Merck M-strain ラットと Sherman ラットの交配による雑種 13M 系ラットの中に、肥満となる自然発症型肥満モデルラット (ZF ラット) を観察した。この ZF ラットは、レプチン受容体の細胞外ドメイン、269 番目のコドンがグルタミンからプロリンに置き換わっており、原因となった単一突然変異劣性遺伝子は、fa (fatty) と名付けられた^{28, 29)}。

このように、ZF ラットは、レプチンの受容体の変異によりレプチン抵抗性を示すために、食欲抑制が効かず肥満を発症するモデルとして利用されている代表的な肥満モデルラットである。この ZF ラットに対して、Cusin ら³⁰⁾は、レプ

チンの脳室内注射を行い、レプチン受容体が変異している状態でも、体重の減少、および Neuropeptide Y (NPY) 濃度の減少が生じることを確認した。しかしながら、ZF ラットが正常のラットと同様の効果を引き出すためには明らかに多量のレプチンの投与が必要であった。また、Yamashita ら³¹⁾は、ZF ラットの変異型レプチン受容体の特徴を明らかにするために、レプチン変異型と野生型のクローン細胞を用いて、レプチンにより安定的に誘導される初期遺伝子 c-fos と c-jun の mRNA 発現を検討した。この実験では、変異型の細胞は、野生型の細胞に比較し、レプチンに対する結合親和性の低下とシグナル伝達の減少が生じていることが確認された³¹⁾。これらの報告から^{30,31)}、ZF ラットのレプチン受容体の変異の影響は、レプチンシグナルの全てが阻害されているのではなく、レプチンシグナルが減弱されていることが示唆された。

レプチンは、脂肪細胞より分泌され、主に視床下部の受容体を介して強力な摂食抑制やエネルギー消費亢進をもたらすことから、レプチンシグナルの作用不足は過食状態やエネルギー代謝異常を誘発し、肥満症の成因となることが知られている³²⁾。したがって、レプチンシグナルが減弱している ZF ラットは、過食、エネルギー代謝異常、過剰な脂肪蓄積などが慢性的に観察される。ZF ラットは 17 日齢時にはすでに、Zucker Lean (ZL) ラット (ZF ラットの対照として用いられる同系統の非肥満ラット) と比較して食餌量や体重が明らかに増加しており³³⁾、3~5 週齢で著しい肥満状態となる³⁴⁾。14 週齢時の ZF ラットの体脂肪率はおおよそ 40% であると報告され³⁵⁾、最終的には ZL ラットが 20% 程度の体脂肪率であるのに対し、ZF ラットは 50% ほどに達する。このように、ZF ラットは生まれてから 14 週齢頃までの期間に過食や肥満の進行が著しいのが特徴である。加えて、ZF ラットは、肥満の進行に伴い、高脂血症、高コレステロール血症^{36,37)}、高インスリン血症、脂肪肝³⁸⁾、脂肪細胞の肥大および過形成が生じることが報告されている^{37,39)}。そのため、ZF ラットは、自然発症型の

肥満モデルとして、生活習慣病のための創薬研究や肥満研究において多用されている⁴⁰⁾。

一方、高血糖を示す ZF ラット同士の交配によって派生したのが Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットである⁴¹⁾。ZDF ラットは、インスリン抵抗性を示す肥満モデル動物であり、レプチン受容体異常、高レプチン血症、空腹時高血糖を示す 2 型糖尿病モデルである。この点において、ZF ラットは、わずかなインスリン抵抗性を示すものの、空腹時高血糖を示さない。したがって、ZF ラットは単純性肥満モデルとして、ZDF ラットは 2 型糖尿病モデルとして区別して用いられている。

(2) ZF ラットの肝

ZF ラットは、脂肪肝のモデルラットとしても多く用いられており、脂肪肝予防・改善のための栄養学的な研究⁴²⁾や、肝移植に関する脂肪肝ドナーの使用に関する研究⁴³⁻⁴⁵⁾などで広く用いられている。

ZL ラットと ZF ラットの肝組織については、形態学的な観察より、その特徴が捉えられている。ZL ラットの肝組織では、ほとんど脂肪沈着は確認されず、肝細胞は正常な形を保っていることが報告されている⁴⁴⁾。また、毛細胆管が肝組織全体に等しく分布しており、ミトコンドリアとグリコーゲン顆粒が豊富に確認される⁴⁴⁾。一方、ZF ラットの肝組織は、肝門脈周囲に大滴および微小空胞脂肪滴が多数確認され⁴⁶⁾、過度な脂肪肝^{44, 47, 48)}と、脂肪滴による肝細胞の形態の歪み⁴⁴⁾が観察される。また、毛細胆管とグリコーゲン顆粒は門脈周囲の肝細胞に限定して観察され、脂肪蓄積が生じている領域ではあまり確認されないことが報告されている⁴⁴⁾。このように、ZF ラットの肝では、細胞の形態学的な乱れが観察されている。

また、ZF ラットの肝は、ZL ラットと比較した際に、過剰な脂肪蓄積と共に、Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の核へのトランスロケ

ーション(活性化)⁴⁸⁾, Fatty acid translocase/cluster of differentiation 36 (FAT/CD36)の細胞膜上へのトランスロケーション(活性化)⁴⁹⁾, PPAR- γ co-activator-1 α (PGC1 α)の遺伝子発現の低下⁵⁰⁾が報告されている。ZFラットの肝組織は、過剰な脂肪蓄積が生じるものの、通常飼育下では脂肪性肝炎に進行することは少なく、肝炎への進行には、高脂肪食⁵¹⁾や Lipopolysaccharide (LPS) への曝露⁵²⁾などの要素が必要となることが報告されている。

これらの現象は、非アルコール性脂肪肝で観察される変化と類似している。したがって、ZFラットの肝は脂肪肝の有用な実験モデルとして用いることが可能と考えられた。

(3) ZFラットと OLETFラット

広く用いられている肥満モデルラットとして、ZFラットの他に Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットがある、OLETFラットは、コレシストキニン-A受容体欠損が肥満発症の原因であることが報告されている⁵³⁾。ZFラットとOLETFラットは共に、過食、肥満、脂肪肝などが観察され、その表現型は類似しているが、一時的な絶食に対する応答が異なることが報告されている⁵⁴⁾。Biら⁵⁴⁾は、OLETFラットは、急性的な絶食状態に反応して、その後の再摂食時に餌の摂取量が増加したことを報告した。それに対し、Sanacoraら⁵⁵⁾は、ZFラットは、絶食後の代償的な摂取量の増加が誘発されなかったことを報告した。ZFラットは、レプチンの下流に存在する摂食促進神経ペプチドのNPY(空腹時に増加することで知られている⁵⁶⁾)が慢性的に亢進状態であることが報告されている⁵⁷⁾。一方で、OLETFラットは、空腹時にNPYに対して標準ラット以上に敏感に反応することで過食となることが報告されている⁵⁸⁾。これらの過食メカニズムの違いからZFラットとOLETFラットの特徴を解釈すると、ZFラットは、体内のエネルギー状態に対する調節機構を一部失っていることにより慢性的に過食状態であり、OLETFは、食欲調節が保たれているもの

の NPY により過敏に反応することで摂餌量が増加するモデルであると考えられる。

(4) ZF ラットの食餌制限に関する先行研究

ZF ラットに対する食餌量の調節に関する先行研究では、ナロキソニン⁵⁹⁾やコレシストキニン⁶⁰⁾の投与など、薬理的な作用により食欲を減弱させた研究や、強制的な食餌制限によって ZF ラットの過食や体重を抑制した報告が存在するが、いずれも、体重の増加が抑制されても体脂肪率の改善が生じていない。

先行研究では、Azain ら⁶¹⁾が 5 週齢の ZF ラットに対して餌を飽食条件の 75% 量に制限した条件で 6 週間、Chiba ら⁵⁰⁾が、4 週齢の ZF ラットに対して餌を 60 ~ 70% 量に制限した条件で 20 週間飼育を行ったが、いずれも食餌制限により体重の増加が抑制されても、体脂肪率は減少しなかったことが報告された。また、Chiba らの実験では⁵⁰⁾、食餌制限において、血中遊離脂肪酸 (Free fatty acid ; FFA) , 肝の Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) , PGC1 α , Carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) , Glucose-6-phosphatase (G6Pse) の遺伝子発現の増加が観察された。さらに、Cleary ら⁶²⁾は、3 週齢の ZF ラットに対し、3 週間食餌制限 - 3 週間自由摂取のサイクルを 4 回繰り返す実験を行った。ZF ラットと ZF ラットの食餌制限期間中と再摂食期間中 (食餌制限期間後の自由摂取期間) の肝脂肪酸合成系酵素の比較が行われ、グルコース 6 リン酸脱水素酵素、リンゴ酸酵素、脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase ; FAS) の活性は、ZF ラットで再摂食時に高い活性を示したことが報告された。一方、ZF ラットは、食餌制限期間と再摂食期間に肝の脂肪酸合成系酵素の活性に差はなく、食餌制限に対する肝の酵素活性の応答が ZF ラットと ZF ラットでは異なることが示された。このように、ZF ラットに対する食餌制限は、体重の増加を抑制するものの体脂肪の蓄積や脂質代謝に関連した応答は必ずしも改善されていない報告が多い。

その一方で、インスリン抵抗性に関しては、Zheng ら⁶³⁾により、5 週齢から 25 週齢までの期間に 60% 量に制限した食餌制限を実施した結果、肝の Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 活性と p70 S6 kinase 活性の抑制を介してインスリン抵抗性が改善されたことが報告された。

このように、ZF ラットに対する食餌制限は、インスリン抵抗性に対して有効に作用する可能性があるが、体脂肪の減少にはつながらないことが報告されている。ZF ラットの食餌制限の実施による、肝脂肪蓄積の結果は、現時点で報告が見当たらず、研究データの蓄積の必要性が考えられた。

(5) ZF ラットの活動量・運動に関する先行研究

先行研究により、ZF ラットは骨格筋が発達不良であること⁶⁴⁾と活動量が低いこと⁶⁵⁾が報告されている。本来、哺乳類は自身の体重を重力に拮抗して支える必要があるため、体重の増加に見合うだけの骨格筋の発達が恒常的に生じる機構が備わっているとされている。その骨格筋の発達調節には、トロポニン T が関与していることが知られているが、Schilder ら⁶⁴⁾は ZF ラットには部分的なトロポニン T の欠如が生じていることを報告した。すなわち、ZF ラットの骨格筋は、通常のラットに比較して未発達であることが示された。この報告に関連すると考えられるのが、Towa ら⁶⁵⁾の ZF ラットと ZL ラットの 24 時間の活動量をパワースペクトル解析にて比較した報告である。ZL ラットは暗期で活動的なるのに対し、ZF ラットは 24 時間低活動状態が維持されたことが報告された。また、24 時間の心拍数の推移を観察した結果、ZF ラットは 24 時間常に ZL ラットより低く推移した。このことから、ZF ラットは通常飼育下で非常に低い活動状態を維持しており、恐らく、骨格筋が未発達であることと関連していると考えられた。以上のことから、ZF ラットは、我が国の近年の生活状態を反映しうるような、運動不足・不活動状態、骨格筋不足のモデルとして有効であると考えられた。

ZF ラットに対する運動の介入については、糖代謝の改善を中心に比較的良好な効果が報告されている。Deb ら⁶⁶⁾は、6 週齢の ZL ラットと ZF ラットに対する 11 週間の強制走運動の効果を食餌制限条件下（ZL ラットの通常飼育群とのペアフィーディング）で検討した。食餌制限と運動を合わせて実施したことにより、体タンパク質量の増加と体脂肪量の減少が確認された。また、運動習慣が糖代謝に及ぼす影響について、Friedman ら⁶⁷⁾が 6 週齢または 18 週齢から 36 週齢までの期間、Saengsirisuwan ら⁶⁸⁾が、6 週齢からの 12 週齢までの期間、Christ ら⁶⁹⁾が 7 週齢から 14 週齢の期間に ZF ラットに強制走運動を実施させた実験を行った。その結果、習慣的な運動の実施は、骨格筋の糖取り込みに関与する輸送担体タンパク質である Glucose transporter type 4 (GLUT4) の発現を増加させたこと、骨格筋でのインスリン抵抗性とインスリン受容体シグナル伝達が改善されたことが報告された。また、Chang ら⁷⁰⁾は、ZF ラットに 8 週間の強制走運動を実施させ、グルコース負荷試験と、肝の PEPCK の発現を検討した。その結果、ZF ラットの運動によるインスリン抵抗性改善メカニズムについて、運動により肝の PEPCK が抑制されたことが関係している可能性が報告された。このように、ZF ラットに対する運動の効果に関しては、糖代謝を中心に多くの研究がされており、ZF ラットの糖代謝異常の予防や改善には運動の実施が有効に作用する可能性が示唆されている⁶⁷⁻⁷⁰⁾。

一方、肝の脂質代謝に関しては、ZF ラットを用いた研究は少なく、Fiebig ら⁷¹⁾の報告が唯一であると思われる。Fiebig ら⁷¹⁾は、雌の ZF ラットを用い、高コンスターチ食条件下における運動の効果を検討した。その結果、ZF ラットで亢進している肝デノボ合成酵素の 1 つである FAS の活性は、運動の実施によって抑制されたことが明らかとなった。したがって、ZF ラットに運動を実施した際の肝脂肪蓄積への影響は、肝脂肪蓄積の抑制に有効に作用することが予想されるものの、その詳細については先行研究では明らかにされていない。

以上のことから、ZF ラットは、不活動、骨格筋の発達不良モデルとして、近年、身体活動量の低下が問題となっている我が国の国民の状況により近いモデルであると考えられた。ZF ラットの肝脂肪蓄積に対する運動の効果が明らかとなれば、普段身体活動量が低い者に対する運動習慣の重要性を示すことにつながると思われた。

第 6 節 本研究の目的

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

これまでも、肥満に対する運動の効果^{10, 72-75)}や食餌制限の効果^{10, 72, 76)}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しての改善効果の検討が多く^{7-10, 72, 77)}、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^{50, 61-63)}と運動の効果^{66-69, 71, 78-80)}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

(1) 対象と群分け

本実験は、和洋女子大学における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 ZL (fa/+ または +/+) ラットおよび ZF (fa/fa) ラット（日本チャールズリバー）を用い（図 1）、供給後、1 週間の適応期間をおいて実験を開始した。ZL ラットを対象群（Lean ; L, n=6）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, n=6）、食餌制限群（Dietary Restricted ; DR, n=6）、食餌制限+運動群（Dietary Restricted + Exercise ; DR + Ex, n=6）に群分けした。

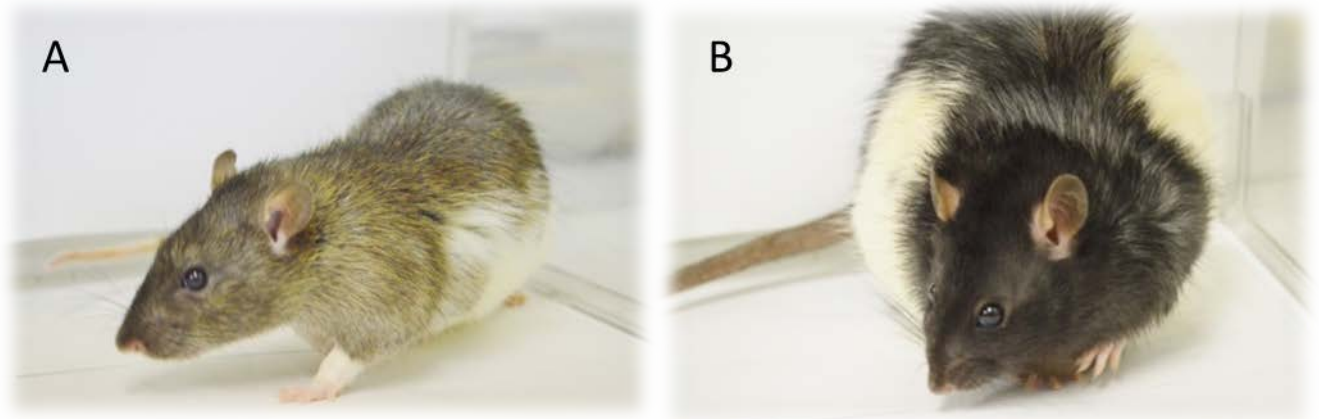


図 1 実験動物

12 週齢時の Zucker lean ラット(A), Zucker Fatty ラット(B)を示した。
自然発症の過食性肥満モデルラットとして、肥満研究において良く用いられている。

(2) 飼育条件

L 群, Ob 群, DR 群のラットは, ステンレス製のメッシュケージ内で, DR+Ex 群のラットは, 居住空間を有する加負荷式回転自発運動量測定装置(円周 1m) (YTS 山下技研) 内でそれぞれ個別飼育した(図 2)。DR+Ex 群の運動装置には, 春日ら⁸¹⁾の報告を参考に, ラットに体重の 30%の負荷がかかるよう設定した。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)を用いた(表 1)。L 群, Ob 群の餌は自由摂取とし, DR 群の餌は Ob 群の摂取量の 30%減となるように制限給餌を行った。この食餌制限量は, DR 群の最終体重が Ob 群より有意に低値になるように, 先行研究を参考とした上で予備実験を行い決定した。DR+Ex 群は, 運動を実施させた上で DR 群と体重が一致するように給餌量をコントロールした。飲料水は全ての群において, 水道水の自由摂取とした。飼育室は 7:00 点灯, 19:00 消灯とした。室温は, $21.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$, 相対湿度は $45.3 \pm 4.0\%$ に維持された。体重, 摂餌量, 走行距離の計測は毎日同時刻に行った。

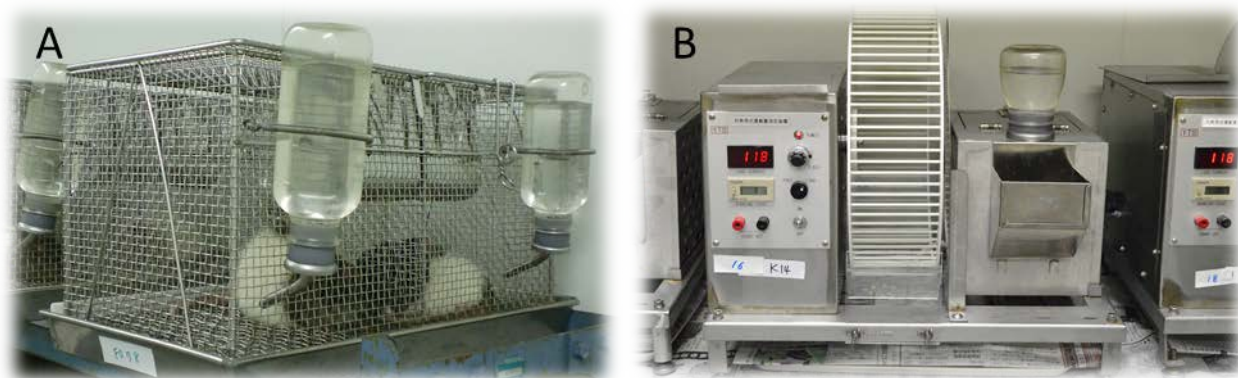


図 2 実験で使用したラットのケージ

図は, L 群, Ob 群, DR 群が使用した通常のケージ(A), DR + Ex 群が使用した加負荷式回転自発走装置(B)を示した.

表 1 餌の組成

げっ歯目動物用固形飼料(NMF:オリエンタル酵母工業)

一般成分	100gあたり
水分 (g)	7.3
粗蛋白質 (g)	27.5
粗脂質 (g)	4.6
粗灰分 (g)	7.4
粗繊維 (g)	4.4
可溶性無窒素物 (g)	48.9
カロリー (kcal)	347

(3) 試料採取

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.

(4) 血中分析

血中トリグリセライド (TG) 濃度の定量には、トリグリセライド E-テストワコー (TG E-test wako, 和光純薬) を、血中 FFA 濃度の定量には、NEFA C-テストワコー (和光純薬) を、血中レプチン濃度の定量は、Rat Leptin ELISA キット (矢内原研究所) を、血中インスリン濃度の定量には、モリナガラットインスリン測定キット (森永生科学研究所) を用いて行った。

血中総コレステロール (TCHO ; Total cholesterol) 濃度、血中高比重リポタンパクコレステロール (HDLc ; High-density lipoprotein cholesterol) 濃度、血中グルコース濃度、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST ; Aspartate transaminase) 値、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT ; Alanine transaminase) 値は、ドライケム (富士フイルム) を用いて測定した。Homeostasis model assessment ratio, homeostasis model assessment as an index of insulin resistance (HOMA-IR) の値を血中グルコース及び血中インスリン濃度から算出した⁸²⁾。

(5) 肝組織中の脂質分析

肝組織中の脂質抽出は、Folch ら⁸³⁾の方法に準じて行った。すなわち、肝組織 1g あたりクロロホルム/メタノール (2 : 1,v/v) を 15ml 加え、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートした。濾紙を用いて濾過し、脂質抽出液と肝臓残渣に分離し、得られた脂質抽出液にクロロホルム/メタノール (2 : 1,v/v) を加えることで 20ml の一定容量とした。さらに、0.37%塩化カリウム水溶液 4ml を添加し、転倒混和により懸濁させ、4°Cで一晩静置した。その後、水層を除去し、クロロホルム/メタノール/D.W 抽出液 (3 : 48 : 47,v/v) 4ml を添加して再度転倒混和し、しばらく静地させて再び分離した後に水層とフラッグを除去した。その後、1ml メタノールを加え、さらにクロロホルム/メタノール (2 : 2,v/v) を加えることで 25ml の一定容量とし脂質抽出液とした。脂質定量用サンプルの調整は、脂質抽出液から 0.2ml を採取し、窒素気流下で濃

縮凝固させた後、0.1ml イソプロピルアルコールに懸濁させた。得られた試料中の TG を測定キット (TG E-Test Wako, 和光純薬株式会社) を用いて定量し、肝組織 1g あたりの含有量として算出した。

(6) 肝組織の組織学的分析

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。

(7) 統計処理

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

(1) 実験期間中の体重変動

実験期間中の 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 (図 3, A)。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 (図 3, B)。

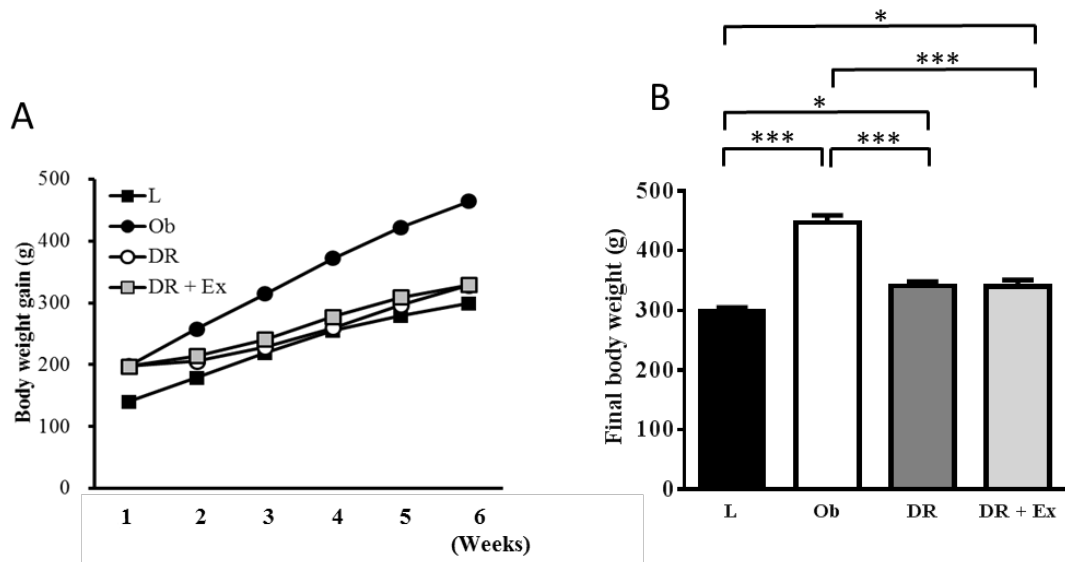


図 3 体重の変化
6 週間の体重の推移 (A) と解剖時の体重 (B) を示した。
*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$. 平均 ± 標準誤差, $n = 6$

(2) 1 日あたりの摂餌量, DR+Ex 群の走行量

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 (図 4, A). 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 (図 4, B).

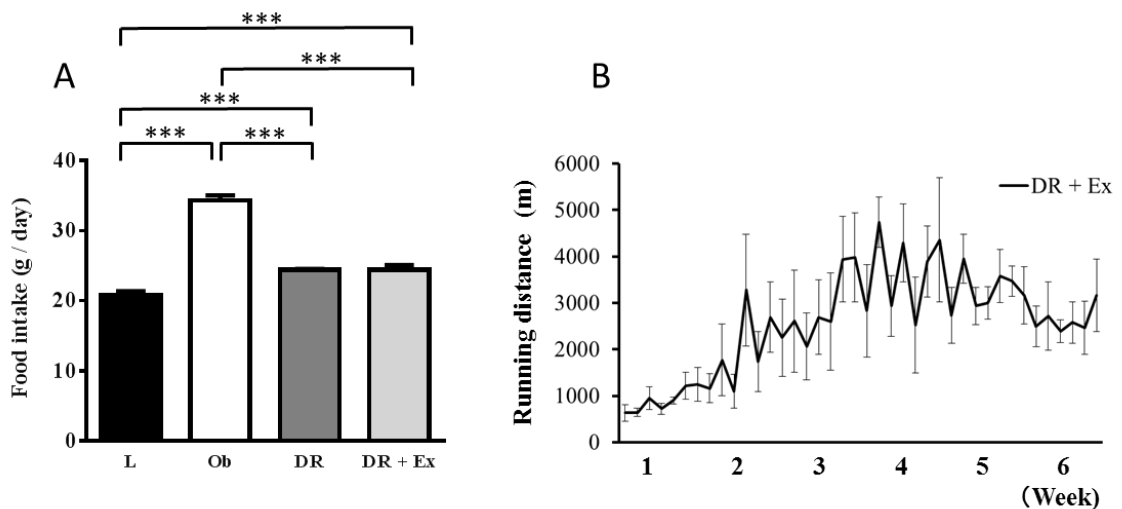


図 4 1 日あたりの餌の摂取量と DR+Ex 群の走行距離の推移
1 日あたりの餌の摂取量 (A) は, 6 週間の平均の値を示した. DR+Ex 群の走行距離 (B) は, 1 日あたり平均すると $2553 \pm 425\text{m}$ であった.
***: $P < 0.001$. 平均 ± 標準誤差, $n = 6$

(3) 組織湿重量の比較

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 ($P<0.01$)

(図5, A) . 体重あたりの精巣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 ($P<0.001$) (図5, B) . 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 ($P<0.001$) (図5, C) .

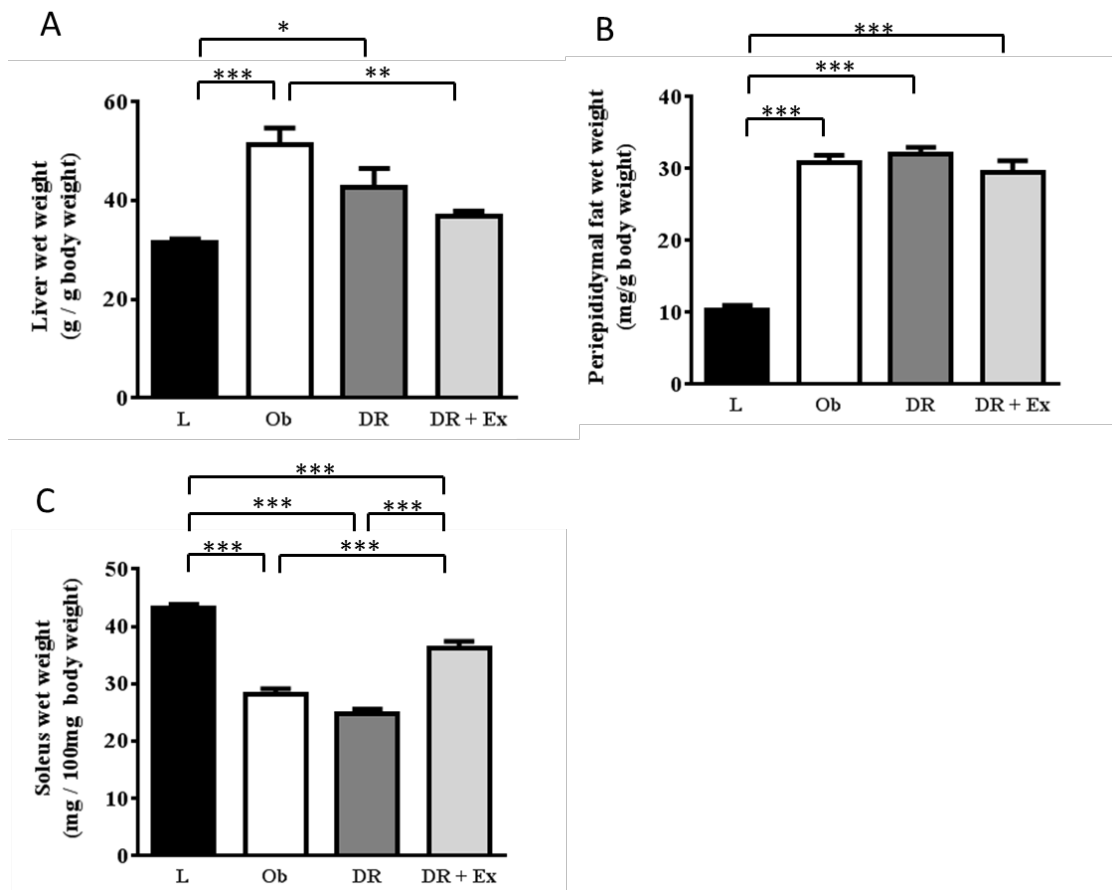


図5 肝, 精巣上体周囲脂肪, ヒラメ筋湿重量

肝(A), 精巣上体脂肪(B), ヒラメ筋(C)の体重あたりの湿重量を示した.

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$. 平均±標準誤差, n=6

(4) 血中分析

1. 血中 TG, TCHO, HDL-C 濃度

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 (図 6, A) . 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 (図 6, B) . 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 ($P<0.001$) (図 6, C) . 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 (図 6, E) . 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 ($P<0.001$) .

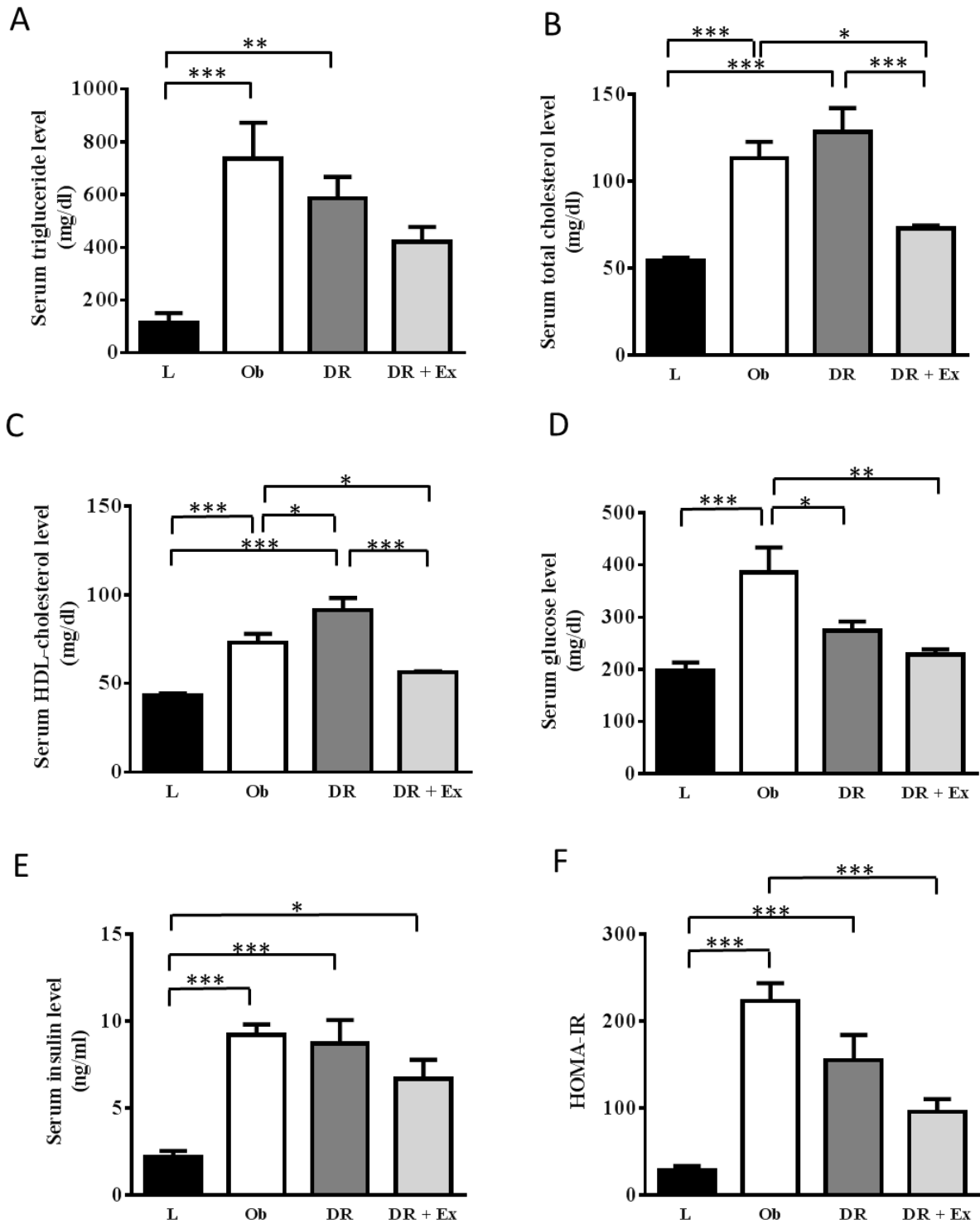


図 6 血中 TG, T-CHO, HDL-C, グルコース, インスリン濃度とインスリン抵抗性
 血清中の TG: 中性脂肪 (A), T-Cho: 総コレステロール (B), HDL-C: HDL コレステロール (C), グルコース (D), インスリン (E) 濃度を示した. 血清グルコース血清インスリン濃度から HOMA-IR (インスリン抵抗性) を算出した.
 *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$. 平均 ± 標準誤差, $n = 6$

2. 血中 FFA, レプチン濃度

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 ($P<0.05$) (図 7, A). 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 ($P<0.001$) (図 7, B).

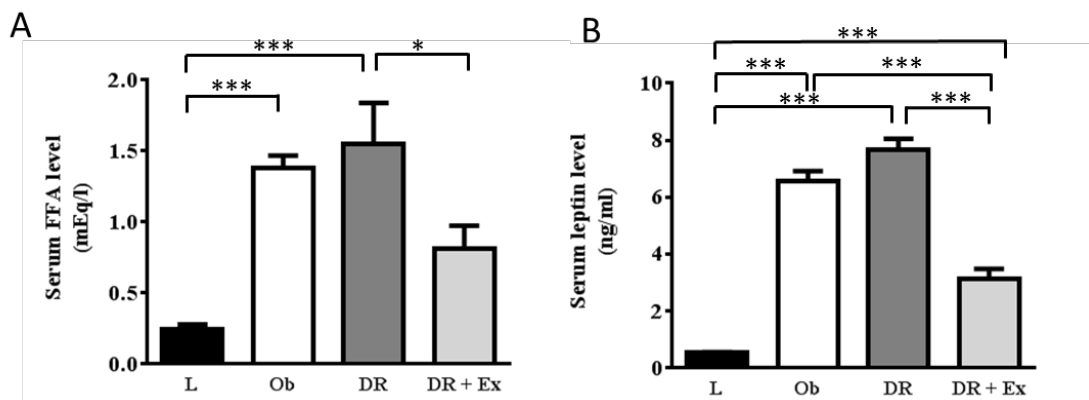


図 7 血中遊離脂肪酸とレプチン濃度

血清中の FFA: 遊離脂肪酸 (A) とレプチン (B) 濃度を示した.

*: $P<0.05$, ***: $P<0.001$. 平均±標準誤差, $n=6$

3. 血中 AST, ALT 値

血中 AST 値は, L 群に比較し DR 群が有意に高値を示した ($P<0.05$) (図 8, A). 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 ($P<0.05$) (図 8, B).

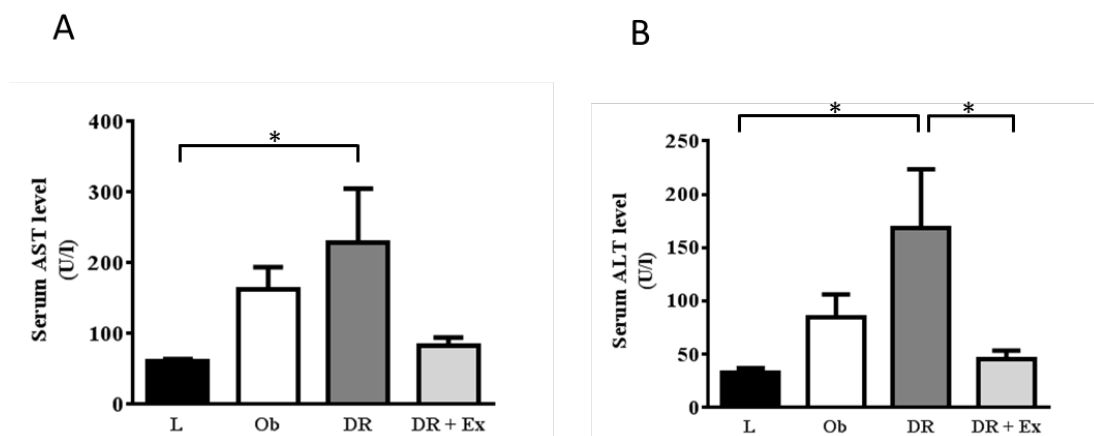


図 8 血中 AST と ALT 濃度

AST:アスパラギン酸アミノ基転移酵素(A)とALT:アラニンアミノ基転移酵素(B)濃度を示した.

*: $P < 0.05$, 平均±標準誤差, $n=6$

(5) 肝 TG 含有量と肝組織所見

HE 染色を行った肝組織の光学顕微鏡像を示した (図 9) . 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 ($P < 0.05$) . また, DR 群に比較し, DR+Ex 群は有意に低値を示した ($P < 0.001$) (図 10) .

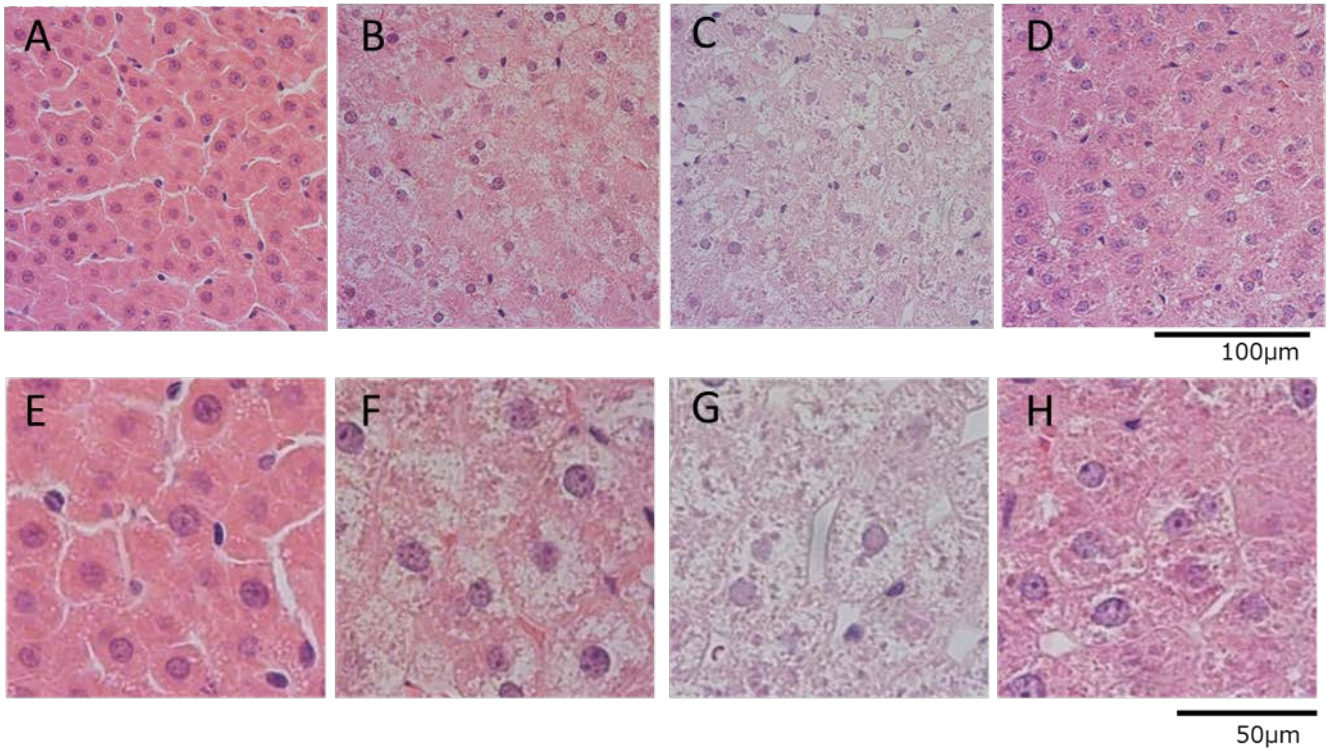


図 9 肝組織の光学顕微鏡所見 (ヘマトキシリンエオジン染色)
L 群(A, E), Ob 群(B, F), DR 群(C, G), DR+Ex 群(D, H)の代表的な所見を示した。

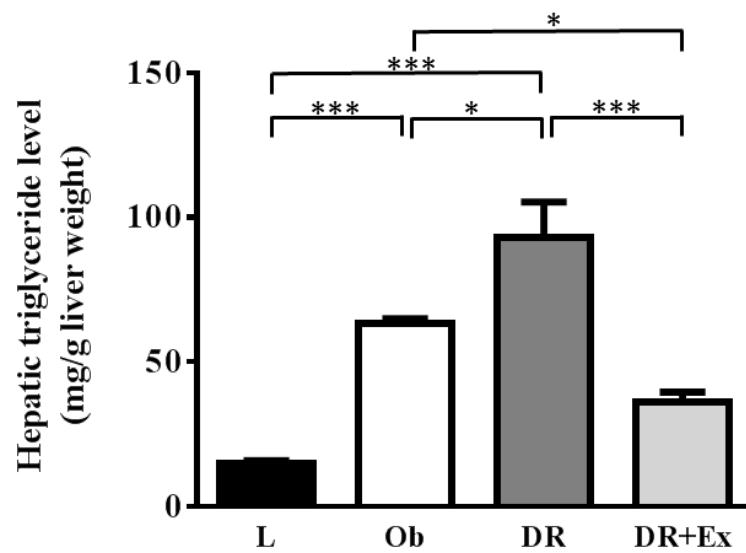


図 10 肝 TG 含有量

肝組織中の肝重量 1g あたりの TG: 中性脂肪含有量を示した。
*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ 平均 ± 標準誤差, $n = 6$

第4節 考察

(1) 肝脂肪蓄積の抑制に対する運動と食餌制限の効果の違い

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。

本研究の飼育期間中の平均摂餌量と実験終了時の体重は、食餌制限群と食餌制限+運動群の間に有意な差が認められなかった。このことから、食餌制限+運動群で実施した習慣的な運動は、体重の減少に貢献しないレベルのものであったと考えられた。一方、下肢骨格筋の一つであるヒラメ筋重量は、肥満群、食餌制限群に比較し、食餌制限+運動群で有意に増加した。従って、食餌制限+運動群で実施した自発走運動は、体重に影響を及ぼさなかったものの、下肢骨格筋の肥大を誘導するものであったことが確認された。このような運動の実施により、食餌制限+運動群では、肝脂肪蓄積に関して食餌制限群と対照的な結果が導かれた。すなわち、食餌制限+運動群に観察された肝脂肪蓄積抑制効果は運動習慣によるものであると推測された。

さらに本研究では、ZF ラットで観察される耐糖能異常に対する運動習慣と食餌制限の影響について、血中グルコース濃度、血中インスリン濃度、HOMA-IR の検討から評価を行った。食餌制限群に比較し、食餌制限+運動群で、耐糖能の悪化に対する抑制効果が顕著に観察されたものの、食餌制限単独であっても、

耐糖能異常を抑制する傾向が確認された。耐糖能異常が観察された肥満群に比較し、食餌制限群と食餌制限+運動群共に耐糖能異常が抑制されたことから、食餌制限に加えて、習慣的な運動を併用することで特異的に生じる効果は、主に脂質代謝に観察されると考えられた。

体重の増加に影響を与えないレベルの運動によって効果が得られている先行研究として、Delghingaro-Augusto ら⁷⁹⁾が、ZDF ラットに自発走運動を実施した結果、ZDF ラットにおいて観察される膵 β 細胞の障害が抑制されたことを報告している。この研究の自発走運動の走行距離は平均して 4200m と本研究よりも若干多かったが、この運動習慣による体重や摂餌量の変化は本研究と同様に認められていない。本研究において、運動習慣の効果が体重の抑制よりも、内臓組織の代謝改善で先行して認められた点については、Delghingaro-Augusto ら⁷⁹⁾の報告と一致するものであった。本研究の食餌制限+運動群の一日あたりの走行量の平均値は $2553\text{m} \pm 425\text{m}$ であり、6 週間を通して最も走行量の少なかった個体で 1 日あたり平均 1861m、最もよく走った個体で 4594m とばらつきがみられた。加えて、同一個体でも日により 2~3 倍の差が生じていた。このように、本研究の走行量には大きなばらつきがあったにも関わらず、食餌制限+運動群の全てのラットで例外なく肝脂肪蓄積が抑制された。このことは、ZF ラットの肝脂肪蓄積の抑制に限定していえば、運動を実施すること自体が重要であったことを示していると考えられる。

時間、速度、頻度を決めてトレッドミルで行う強制走運動の手法を採用した先行研究では、ZF ラットに対し、Deb ら⁶⁶⁾は、速度 1mph(=26.8m/min)、傾斜 4 度で 60 分、Chang ら⁷⁰⁾は、速度 20 m/min で 60 分、Friedman らは、20 m/min、傾斜 15 度で 90 分、それぞれ週 5~7 回の頻度で強制走運動を実施している。いずれも肝脂肪蓄積への検討は行われていないものの、糖代謝に関する項目については本研究と同様に運動の実施によって良好な結果が報告されている。これら先行研究のトレッドミル強制走運動の条件を一日あたりの走行量に換算すると、

いずれも本研究の1日あたりの走行量の平均値である2553mよりも少ない値であった。本研究の自発走運動については、走行速度や、1回の継続時間などの走行運動の詳細な特徴は明らかではない。そのため、走行距離のみからの考察となるが、本研究の自発走運動は、体重には影響を与えなかったものの、糖・脂質代謝には十分に運動の効果が生じる量が確保されていたと考えられた。それは、慢性的に低活動状態である⁶⁵⁾ZFラットであるからこそ、運動を行うこと自体が重要であり、体重に影響を与えないレベルの運動であっても得られる効果が大きかったのかもしれない。ZFラットの肝脂肪蓄積を顕著に抑制した本研究の自発走運動の特徴（量、強度、頻度等）を明確にしていくことが、本研究結果の発展に繋がると考えている。

本研究の食餌制限群と食餌制限+運動群は、異なる体重抑制手段によって、同じ程度に体重の増加が抑制された。その結果、肝脂肪蓄積は、食餌制限+運動群で抑制されたが、食餌制限群では進行した。このことは、単に体重を抑制するのではなく、どのような手段で体重を抑制するかが重要であることを意味すると考えられる。これらの結果から、運動習慣により体重に影響が現れない場合であっても、肥満に伴う肝脂肪蓄積に対する予防効果が認められることが明らかとなった。

(2) OLETFの先行研究と比較して

先行研究において、食餌制限と運動の効果を比較した研究は、肥満モデルラットであるOLETF（コレシストキニン-A受容体欠損）を用いた研究において報告されている。Rectorら⁸⁴⁾とFletcherら⁸⁵⁾は、OLETFラットを4週齢から40週齢までの期間、餌の量を飽食時の70%で飼育した群と自発走運動条件で飼育した群で比較を行った。Rectorら⁸⁴⁾とFletcherら⁸⁵⁾の実験条件は、本研究と同じ程度の食餌制限を負荷しており、また、運動の方法も本研究と同じ自発走運動を採用しているが、本研究に比較し、介入期間が長期であった。Rectorら

⁸⁴⁾は、この実験の結果、食餌制限単独でも、運動単独でも肝脂肪蓄積の改善が認められたことを報告した⁸⁴⁾。ところが、空腹時に肝で発現し、非アルコール性脂肪肝の治療薬としても知られる FGF21 (fibroblast growth factor 21) の肝でのタンパク質発現が抑制されたのは、運動を実施した群のみであった⁸⁵⁾。このことは、運動と食餌制限それぞれの効果の違いを部分的に説明する知見として報告された⁸⁵⁾。

本研究は、食餌制限により体重の増加が抑制されたにも関わらず、食餌制限群で肝脂肪蓄積の改善は認められなかったが、運動を併用することで著しい改善が認められた。すなわち、食餌制限で体重の増加を抑制した際の運動習慣の併用の有無が、肝脂肪蓄積の抑制効果を大きく左右することを確認した。これは、運動の実施には、食餌制限のみでは得られない肝脂肪蓄積抑制作用があることが示唆された結果であり、本研究が初めての報告である。

食餌制限による肝脂肪蓄積の結果が OLETF を用いた先行研究^{4, 84)}の結果と異なった理由としては、ZF ラットと OLETF ラットの肥満発症メカニズムの違いが影響していると考えられる。さらに、本研究では、体重の増加が著しい 6 週齢から 12 週齢までの介入結果であったのに対し、Rector ら⁸⁴⁾と Fletcher ら⁸⁵⁾は 40 週齢までの長期間にわたる介入であった点も、食餌制限と運動に対する応答の違いを生んだ可能性が考えられる。また、OLETF ラットと ZF ラットは、対照群 (Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットおよび ZL ラット) に対する過食の程度が異なり、OLETF ラットに比較し ZF ラットの方が過度な過食状態が観察されることも先行研究との結果の違いに関連している可能性がある。OLETF ラットと同じ割合で食餌制限を実施しても、元々の過食状態が重度である ZF ラットは、生体内で飢餓状態に近い過度な食餌制限と認識された可能性も否めない。栄養不良や過度な絶食による肝脂肪蓄積の亢進は、ヒトにおいても観察されていることから²²⁾、今後、飢餓状態を示すマーカー等の分析を追加することも必要であると思われた。

これらのことを考慮した上で、体重の増加が著しい時期における ZF ラットの食餌制限の実施は、肝脂肪蓄積を悪化させるリスクあり、運動は、ZF の肥満や食餌制限によって悪化した肝脂肪蓄積を顕著に改善する効果を有することが明らかとなった。

(3) レプチン抵抗性と運動

ZF ラットは、レプチン受容体に変異していることによりレプチンの作用不全が生じ、過食となる肥満モデル動物である²⁷⁾。レプチンは、脂肪細胞より分泌されるサイトカインであり、主に視床下部の受容体を介して強力な摂食抑制やエネルギー消費亢進をもたらす⁸⁶⁾。レプチンの作用不全は肥満症の成因となることが知られており、実際にヒトにおいても、遺伝的なレプチンの分泌異常やレプチン受容体の変異・欠損により肥満が生じた症例報告がなされている^{87, 88)}。また、一般的に、肥満者では血中レプチン濃度の増加が観察されるが、一方で肥満が進行すると、レプチンによる摂食抑制作用やエネルギー消費亢進作用が減弱する状態（レプチン抵抗性）が観察されることが知られている⁸⁹⁾。したがって、レプチン抵抗性は、多くの肥満者で観察される一般的な病態であり、生活習慣病の悪化やさらなる肥満の進行を助長する。

レプチン抵抗性に対する運動の効果について、飼育環境により活動量の増加がみられた C57/BL6 マウス（通常マウス）は、非活動的なマウスより外因性のレプチン投与に対するレプチン感受性が高いことが報告されている⁹⁰⁾。また、Bi ら⁹¹⁾は、肥満である OLETF ラットに自発走運動を実施させたところ、レプチン下流にある視床下部の摂食調節シグナルが強化され、食欲の抑制が導かれたことを報告している。このように、レプチン抵抗性の改善に対する運動の効果が指摘されている。

レプチンは、レプチン受容体を介して働く経路が主であるが、受容体を介さない作用機序があることも示唆されており、レプチン受容体に変異が生じてい

る ZF ラットにおいても、レプチン抵抗性状態にありながら外因性レプチンに対する反応性が存在することが報告された³⁰⁾。本研究で、血中レプチン濃度は肝脂肪蓄積と平行な変動を示しており、血中のレプチンは受容体を介さない経路によって、肝脂肪蓄積に何らかの影響を及ぼした可能性が考えられた。また、食餌制限+運動群の運動習慣は、レプチンシグナル伝達経路を強化することによって、ZF ラットの摂食調節や体内のエネルギー調節の異常を改善した可能性も考えられた。本研究の食餌制限や運動による肝脂肪蓄積へ影響は、肥満病態のなかでも特にレプチン作用不全を特徴とする病態において観察される現象であるのかもしれない。

以上のことから、本章では、ZF ラットを用いた実験によって、食餌制限単独で肥満を抑制した場合には肝脂肪蓄積抑制効果が認められなかったが、食餌制限と運動を併用することで肝脂肪蓄積抑制効果が認められたことを報告した。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る。そこで、本研究では、第 2-2 章、第 2-3 章において、本章の結果のメカニズムの追究を行った。

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

(1) 肝組織の分子生物学的分析

1. サンプル調製

第2-1章でラットより摘出した肝組織を用いて分析を行った。ホモジネートバッファーは、HEPES バッファー (50 mM HEPES, 10 mM EDTA, 4 mM EGTA, 50 mM b-glycerophosphate, 25 mM NaF, 5 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, pH 7.4) にホスファターゼインヒビター (PhosSTOP tablet, Roche Diagnostics) とプロテアーゼインヒビター (Complete tablet, Roche Diagnostics) を加えたものを使用した。

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°C10分間加熱し、タンパク質を変性させた。

2. SDS-PAGE およびウエスタンブロット法

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。濃縮ゲルは全て4%とし、分離ゲルの濃度は、Fatty acid synthase（FAS）と ATP citrate lyase（ATP-CL）は6%、FAT/CD36とCPT1Aは8%、Diacylglycerol O-acyltransferase 2（DGAT2）は10%、COXIV（Cytochrome c oxidase subunitIV）は15%とした。10 μ g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、標的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（FAT/CD36：SC-9154, Santa cruz biotechnology. CPT1A：SAB2100476, Sigma Aldrich. COXIV：#4150, FAS：#3180, ATP-CL：#4332, Cell Signaling. DGAT2：ab96094, Abcam）。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（HRP標識抗ウサギIgG抗体：#7074, Cell Signaling）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（ECL

Prime Western Blotting Detection System, GE ヘルスケア) 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.

(2) 脂肪酸酵素活性

肝の 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した. 活性の測定は, Nepokroeff ら⁹²⁾の方法に従って, 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 6.22×10^3 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.

(3) 統計処理

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

(1) FAT/CD36

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. まだ, DR 群は Ob 群, DR+Ex 群に比較し, 有意に高値を示した ($P<0.001$) (図 11).

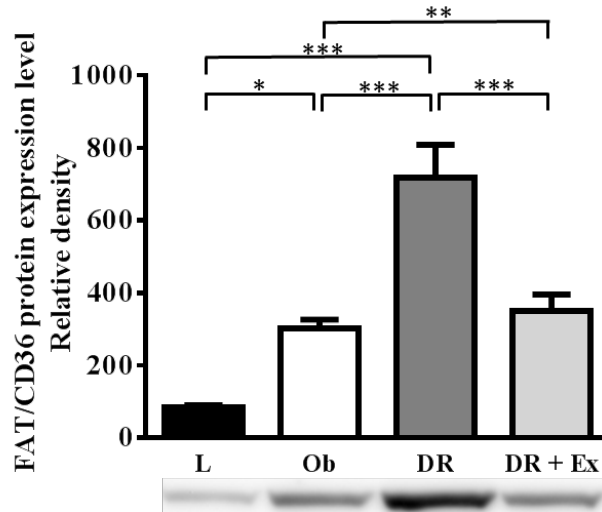


図 11 肝組織の FAT/CD36 相対的タンパク質発現量

FAT/CD36: Fatty acid translocase/Cluster of Differentiation 36 のタンパク質発現量を L 群を 100 とした時の相対値で示した。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 平均 ± 標準誤差, $n = 6$

(2) COXIV と CPT1A

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 ($P < 0.05$) (図 12, A) . 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 ($P < 0.01$) (図 12, B) .

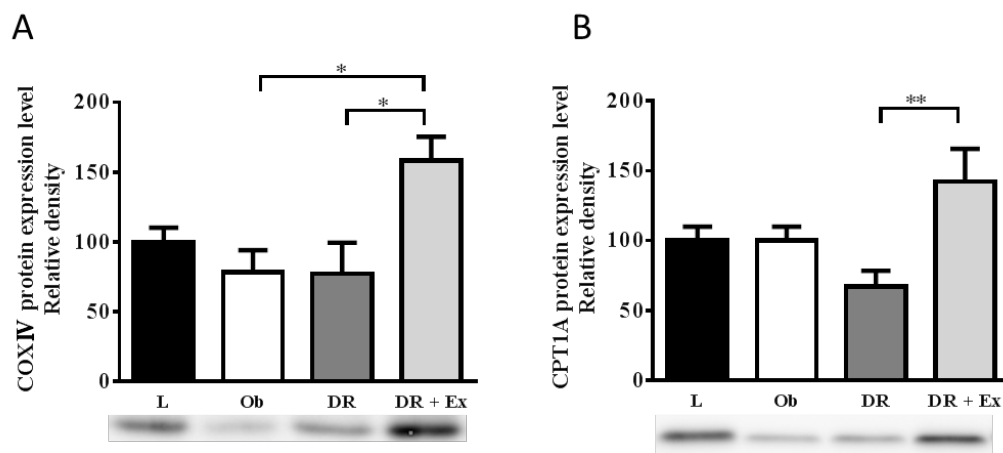


図 12 肝組織の COXIV および CPT1A の相対的タンパク質発現量

COXIV: Cytochrome c oxidase subunit IV (A), CPT1A: Carnitine palmitoyltransferas 1A (B) のタンパク質発現量を L 群を 100 とした時の相対値で示した。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 平均 ± 標準誤差, $n = 6$

(3) ATP-CL, FAS, DGAT2

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(図 13, A)。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(図 13, B)。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(図 13, C)。

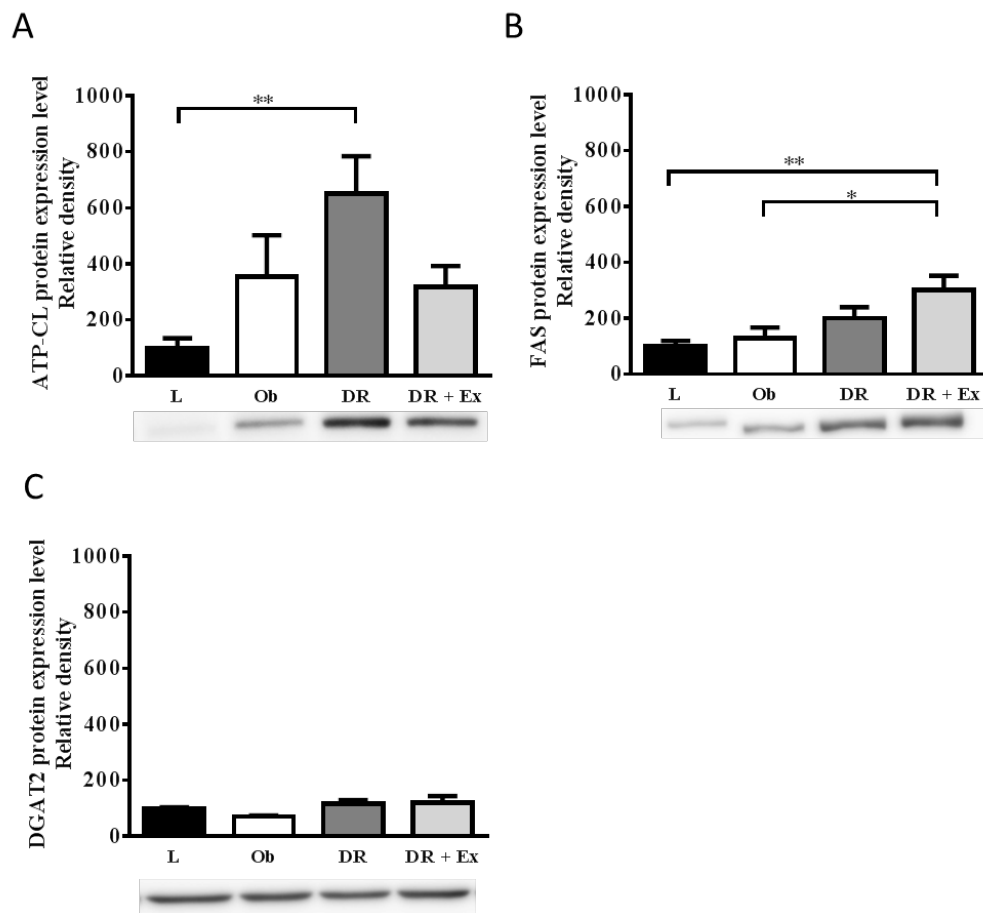


図 13 肝組織の ATP-CL, FAS, DGAT2 の相対的タンパク質発現量

ATP-CL: ATP citrate lyase (A), FAS: Fatty acid synthase (B), DGAT2: Diacylglycerol O-acyltransferase 2 (C) のタンパク質発現量を L 群を 100 とした時の相対値で示した。

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 平均±標準誤差, n=6

(4) FAS 活性

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(図 14).

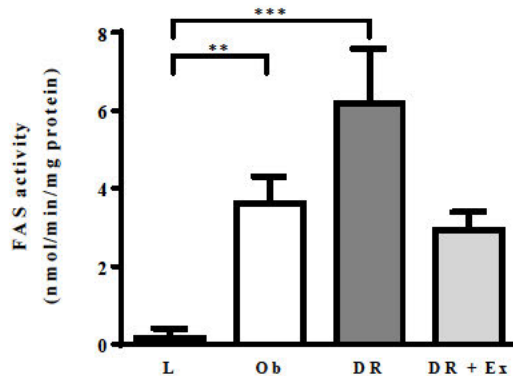


図 14 肝組織の FAS 活性

FAS:Fatty acid synthase のタンパク質量あたりで標準化した活性を示した。
 : $P<0.01$, *: $P<0.001$ 平均±標準誤差, n=6

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. そこで, 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を明らかにするために, この 3 項目に着目して検討を行った. その結果, 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.

(1) FFA と FAT/CD36

肝の脂肪酸輸送タンパク質 FAT/CD36 は, 肝細胞をはじめ, 骨格筋細胞や心筋細胞, 脂肪細胞など, 様々な細胞に発現がみられ, 細胞膜上で FFA の細胞内への取り込みを調節する. 本研究において, 第 2-1 章で示した通り, 血中 FFA 濃度は, 肥満群と食餌制限群で高値を示したが, 食餌制限+運動群は, 低値で

あった。加えて、本章で行った検討により、肝 FAT/CD36 の発現は、肥満群と食餌制限+運動群を比較すると、食餌制限群で有意に高値を示したことが明らかとなった。FAT/CD36 は、血中で増加した FFA を肝細胞内に取り込む働きをする^{93, 94)}。従って、食餌制限群は、血中 FFA の増加と肝細胞内への FFA 取り込みの亢進が関連して過剰な肝脂肪蓄積が生じた可能性が示唆された。一方、この血中 FFA 濃度と肝 FAT/CD36 タンパク質発現量は、肝脂肪蓄積が抑制された食餌制限+運動群で、食餌制限群と比較し有意に低値であった。したがって、運動を行わずに食餌制限のみを実施することが、増加した血中 FFA を肝細胞内に取り込む経路を活発にし、脂肪肝を誘導した可能性が考えられた。

先行研究で、Clugston ら⁹⁵⁾は、脂肪肝を誘導する高炭水化物食やアルコール負荷に対して、FAT/CD36 欠損マウスは耐性を示すことを明らかにした。また、Koonen ら⁹⁶⁾は、高脂肪食に誘導された脂肪肝で、FAT/CD36 が高発現していることを報告し、肝脂肪蓄積の亢進に FAT/CD36 が関与していることを報告した。また、ヒトにおいては、肥満者から肝生検で摘出した組織の分析により、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の組織学的所見と血中 FFA レベル、そして肝 FAT/CD36 レベルの関連性が報告された⁹⁷⁾。このように、FAT/CD36 は肝脂肪蓄積を調節する重要な因子であることが示唆されている。その一方で、Goudriaan ら⁹⁸⁾は、FAT/CD36 欠損マウスにおいて、FAT/CD36 の存在がなくても肝への FFA 取り込みや TG 蓄積が生じることを報告した。この結果について、Goudriaan ら⁹⁸⁾は、肝では、FFA 取り込みに対する FAT/CD36 の貢献が小さく、他の脂肪酸輸送タンパク質の貢献が大きいことを指摘した。同様に、Coburn ら⁹⁹⁾も、FAT/CD36 欠損マウスでは、下肢骨格筋、心筋、脂肪組織の TG 蓄積は抑制されるが、肝の TG 蓄積は抑制されず、肝は FAT/CD36 欠損の影響が小さかったことを報告した。この Goudriaan ら⁹⁸⁾と Coburn ら⁹⁹⁾の研究で使用された FAT/CD36 欠損マウスは、脂肪肝は発症していない。脂肪肝が発症していない肝では FAT/CD36 の発現は少なく¹⁰⁰⁾、通常の生理的範囲での肝 FFA 取り込み

には、FABP（肝臓脂肪酸結合タンパク質）の貢献が大きいことが報告されている^{101, 102)}。したがって、健全な肝は、FAT/CD36に依存せずに脂肪酸の取り込みが行われるが、肥満や脂肪肝、またエネルギー過剰など脂質代謝に異常が生じた際にはFAT/CD36の発現の増加や活性化が生じる可能性が考えられた。すなわち、本研究で使用したZFラットは、脂肪肝を発症するモデルであるため、FAT/CD36に依存した肝へのFFAの取り込みが行われた可能性が高いと考えられた。

骨格筋や心筋においては、運動や食事などの条件により体内の代謝状況が刺激されることでFAT/CD36が細胞膜と細胞質FAT/CD36プールとの間を移動し、脂質代謝を調節することが報告されている¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾。また、ZFラットから単離した肝細胞でFAT/CD36の細胞内局在を検討した先行研究では、インスリン刺激により生じるFAT/CD36の細胞膜上へのトランスロケーションがZLラットと比較してZFラットで活発であったことが示されている⁴⁹⁾。したがって、FAT/CD36の発現量のみならず、細胞内でのFAT/CD36の局在も脂肪酸の取り込みの調節には重要であると考えられた。これらの先行研究から推察すると、ZFラットの脂肪肝では、FAT/CD36が高発現していると共に、細胞膜上へのトランスロケーションが活発であり、FAT/CD36が肝脂肪蓄積の調節に大きく関与していると考えられた。

本研究において、非肥満群（ZLラット）のFAT/CD36はわずかにしか発現が認められていない。体内の代謝異常により肥満群で過剰発現したFAT/CD36は、食餌制限のみの実施によりさらに発現が増加した。一方、その食餌制限に運動習慣を組み合わせたことにより、食餌制限によるFAT/CD36の増加分が抑制された。本研究では、運動習慣のみの条件で検討ができていないため明らかではないが、運動習慣は、肝で過剰に発現したFAT/CD36を抑制する可能性が考えられた。今後、肝のFAT/CD36以外の脂肪酸の取り込みに関係する因子（FATP-1

や L-FABP の発現) , および FAT/CD36 の細胞内局在について追究していきたいと考えている.

(2) COXIV および CPT1A

グルコースや脂肪酸からのエネルギーの産生は主としてミトコンドリアで行われる. 肝のミトコンドリアで脂肪酸 β 酸化が低下すると, TG の蓄積が亢進し, 脂肪肝を誘発することが知られている. 本研究では, ミトコンドリアマーカである COXIV とミトコンドリア外膜に局在し, 脂肪酸から代謝されたアシル CoA をミトコンドリア内へ輸送する CPT1A のタンパク質発現の検討から, 肝組織における β 酸化能について考察した.

食餌制限+運動群の COXIV は, 肥満群, 食餌制限群に比較し有意に高値を示し, 食餌制限+運動群では, 肝組織中のミトコンドリア量の増加が生じたことが示唆された. 本実験モデルにおける食餌制限+運動群の肝のミトコンドリアの増加は超微形態学的な手法においても確認されており¹⁰⁷⁾, COXIV のタンパク質発現量の検討からも同様の結果が確認された. CPT1A のタンパク質発現量は, 先行研究において, ZL ラットと ZF ラットで差がないことが報告されている^{50, 108)}. 本研究では, 先行研究に一致して非肥満群 (ZL ラット) と肥満群 (ZF ラット) の間には有意な差は認められなかった. また, 食餌制限+運動群は, 食餌制限群に比較して高値を示し, 運動習慣を併用することによる CPT1A の増加が示唆された.

先行研究では, ラット初代培養肝細胞と高脂肪食誘導肥満ラットに CPT1 を過剰発現させた結果, 肝脂肪蓄積が抑制されたことが報告された¹⁰⁸⁾. また, OLETF ラットを用いた実験では, LETO ラットと比較して OLETF ラットの肝 CPT1 の活性¹⁰⁹⁾やタンパク質発現⁸⁴⁾が低いことが報告されており, 脂肪肝を有する個体における CPT1 活性の低下が示された. このように, CPT1 は, 肝脂肪蓄積の調節に重要な役割を果たすことが明らかとされている.

運動の影響を検討した研究では、Cintra ら¹¹⁰⁾は、8週間高脂肪食で飼育したマウスに8週間の運動を負荷させたところ、高脂肪食で低下していた肝 Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (p-ACC) と CPTI のタンパク質発現量が増加し、肝脂肪蓄積の抑制に貢献したことを認めた。また、Gonçalves ら¹¹¹⁾は、高脂肪食による脂肪肝において、運動の実施がミトコンドリア膜のリン脂質プロファイルの変化と共に、ミトコンドリア呼吸能を改善させることを報告した。従って、本研究の食餌制限+運動群で観察された COXIV および CPT1A のタンパク質レベルの増加は、先行研究と一致して、運動の実施によりミトコンドリア機能が強化された結果である可能性が考えられた。

また、食餌制限と運動の比較において、OLETF ラットを用いた Rector ら⁸⁴⁾の実験では、運動群でより大きな肝脂肪蓄積抑制効果と、肝におけるβ酸化系酵素の活性化、Oxidative phosphorylation (OXPHOS) complex IV のタンパク質発現の増加を認めたが、CPT1 に関しては、運動群と食餌制限群で同様にタンパク質発現量の増加が観察され、両群に差はなかった。さらに Chiba ら⁵⁰⁾は、ZL ラットと ZF ラットの餌を飽食時の60~70%量に制限して飼育し、食餌制限による肝 CPT1A の遺伝子発現の増加を観察した。したがって、本研究の食餌制限群で肥満群に比べ減少傾向にあった CPT1A タンパク質発現量は、食餌制限の実施により CPT1 が増加したという先行研究^{50),84)}とは異なる結果であった。この結果の違いについては、食餌制限期間の違いが考えられる。Rector ら⁸⁴⁾は、4週齢から40週齢まで、Chiba らは、6週齢から24週齢まで食餌制限を行っており、本研究の6週齢から12週齢までの食餌制限に比較し長期であり、解剖時の週齢も異なった。本研究は ZF ラットの体重の増加が最も著しい時期に食餌制限を行ったが、ZF ラットは本研究で解剖を行った12週齢時以降に体重の増加や過食が減弱し始めることが知られており、代謝特性の変化が生じる時期であったと考えられる。さらに、ミトコンドリアの機能やβ酸化系の酵素活性は、加齢により減弱することが知られている¹¹²⁾。これらのことから、本研究と先行

研究との比較において、食餌制限を介入した期間や週齢が異なったことで、CPT1A 周囲の代謝状況に違いが生じた可能性が考えられた。

本研究では、脂肪酸 β 酸化活性を直接評価できていないことが限界点であるが、CPT1A と CPXIVの結果から、食餌制限+運動群のミトコンドリア内での β 酸化の亢進が推測され、肝脂肪蓄積を抑制したことのメカニズムの一つとして考えられた。

(3) ATP-CL, FAS, DGAT2

ヒトの健康的で特別な刺激のない条件下では、肝脂肪蓄積に対するデノボ脂肪酸合成（内因性の脂肪合成経路）の関与は5%未満であることが報告されている¹¹³⁾。その一方で、脂肪肝の病態では肝脂肪蓄積に対するデノボ脂肪酸合成の関与が高まっていることが報告されている。Donnellyら¹¹⁴⁾は、脂肪肝患者を対象にした研究において、複数の安定同位体を用いた方法で肝脂肪含量に対するデノボ脂肪酸合成由来の脂質の割合を推定した。その結果、約60%が脂肪組織から分解されたFFA由来、10%強が食餌由来であり、残りの30%近くがデノボ合成由来であることを明らかにした。このように、脂肪肝患者ではデノボ脂肪酸合成が増加していることが知られている¹¹⁵⁾。

本研究では、肥満群と食餌制限群で脂肪肝が進行していたことから、デノボ脂肪酸合成系のタンパク質発現も肥満群と食餌制限群で増加した可能性が予想された。結果として、デノボ合成の初期段階に関与するATP-CLの肝でのタンパク質発現量は、食餌制限群が最も高い値を示し、肥満群と食餌制限+運動群はそれに続き、非肥満群は低値であった。一方、FASのタンパク質発現量は、食餌制限+運動群が非肥満群、肥満群に比較し、有意に高値を示した。TG合成の最終段階を触媒するDGAT2のタンパク質発現は、本研究では群間に有意な差は認められなかった。FASのタンパク質発現量が予想に反して食餌制限+運動群で高値を示したことから、酵素活性の測定によってその詳細を検討した。

その結果、FAS の活性は、L 群に比較し、Ob 群、DR 群で高い活性を示し、DR+Ex 群は DR 群に比較して有意に低い活性を示した。多くの報告では、FAS は、正常な肝組織においても発現が認められるが、肥満や糖尿病病態では、特に発現が増加し¹¹⁶⁾、また、運動習慣によって抑制される^{8,17)}ことが示されている。また、FAS の基質となるマロニル CoA は、CPT1A の働きを強力に抑制することで脂肪肝の発症に寄与することが明らかとされている¹¹⁴⁾。本研究の食餌制限群では、FAS のタンパク質発現量は増加していないものの、FAS 活性化が認められた。その理由として、CPT1A が食餌制限群で低値であった結果を考慮すると、食餌制限群の肝では、FAS の基質となるマロニル CoA が豊富に存在した可能性も考えられ、マロニル CoA の存在による FAS の活性化が生じたのかもしれない。しかしながら、本研究の結果からはこの点については十分な説明ができない。FAS のタンパク質発現量と酵素活性の結果の違いについては、今後のマロニル CoA の含有量や、FAS の反応性など検討の余地が残された。

本研究のデノボ脂肪酸合成系の結果は、ATP-CL のタンパク質発現量と FAS の活性において、食餌制限群で増加し、食餌制限+運動群で増加が抑制された傾向が観察された。しかしながら、FAS と DGAT2 のタンパク質発現量の結果からは、脂肪肝におけるデノボ合成系の亢進は確認されなかった。デノボ脂肪酸合成は糖代謝との関連が非常に強く、高糖質食の摂取^{117,118)}や血中グルコース、インスリン濃度の増加¹¹⁶⁾によりデノボ脂肪酸合成が亢進することが明らかとされている。本研究の全身の糖質代謝の結果は、食餌制限群と食餌制限+運動群とも改善がみられた(第 2-1 章)。一方、肝の脂質代謝は食餌制限+運動群でのみ改善し、運動の有無によって両群の効果の違いが明確であった。したがって、このデノボ合成系は、糖代謝と脂質代謝の影響を総合的に受け、糖代謝に強く影響された因子と脂質代謝に強く影響を受けた因子とで傾向が異なったものと考えられた。

本研究では、ZF ラットに対する食餌制限単独の実施により ATP-CL のタンパク質発現量と FAS の活性の亢進が認められたが、脂肪合成の最終段階を調節する DGAT2 の亢進が伴わなかった。一方、食餌制限と運動を併用させた場合には、FAS のタンパク質発現量の増加を認めたが、ATP-CL のタンパク質発現量と FAS の活性の亢進は認められなかった。内因性の脂肪酸合成の結果がどこまで肝脂肪蓄積を説明するかについては、さらなる検討の必要性が示唆された。

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^{119, 120)}。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

(1) 脂肪組織の組織学的分析

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分析に用いた。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^{121, 122)}により行った (図 15)。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。

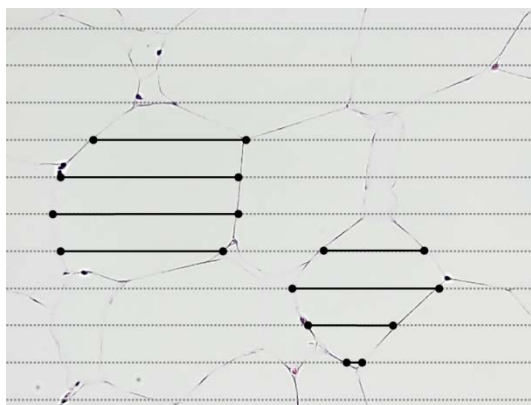


図 15 交点間距離法による脂肪細胞サイズの推定

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。

(2) 脂肪組織の分子生物学的分析

1. サンプル調製

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分析に用いた。市販の 10 倍濃縮 RIPA バッファー (RIPA Buffer 10× ; Cell Signaling Technology, #9806) を DTT (和光純薬) と PMSF (Cell Signaling Technology) を加えて希釈し (最終濃度 : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg/ml leupeptin, 5mM DTT, 1mM PMSF) , プロテアーゼインヒビター (コンプリート プロテアーゼインヒビターカクテル;ロシュ), フォスファターゼインヒビター (ホスファターゼ阻害剤カクテル ; ナカライテスク) を加えたものをホモジネートバッファーとした。

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 4μl 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°C, 10000×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しなるよう調製し、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°C10分間加熱し、タンパク質を変性させた。

2. SDS-PAGE およびウエスタンブロット法

それぞれのタンパク質を分離するために、SDS-PAGEを行った。濃縮ゲルは全て4%とし、分離ゲルの濃度は、Adipose triglyceride lipase (ATGL)は12%, Phospho-hormone-sensitive lipase (p-HSL)は7.5%, Monoacylglycerol lipase (MAGL)とアディポネクチンは15%とした。12.5 μ g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、標的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%スキムミルク含有T-TBSで希釈して使用した(ATGL: ab109251, MAGL: ab24701, Abcam. p-HSL: #4126, アディポネクチン: #2789, Cell Signaling)。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(HRP標識抗ウサギIgG抗体: #7074, Cell Signaling)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(ECL Prime Western Blotting Detection System; GEヘルスケア)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およびウエ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。

(3) 統計処理

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

(1) 脂肪組織の形態学的分析

図 16 に精巣上体脂肪組織の HE 染色像を、図 17, 18 に精巣上体脂肪組織の脂肪細胞の交点間距離法で算出したサイズの分布を、図 19 に精巣上体脂肪組織の脂肪細胞サイズ（交点間距離の平均値）を示した。精巣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（図 18）。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 ($P<0.001$)（図 19）。

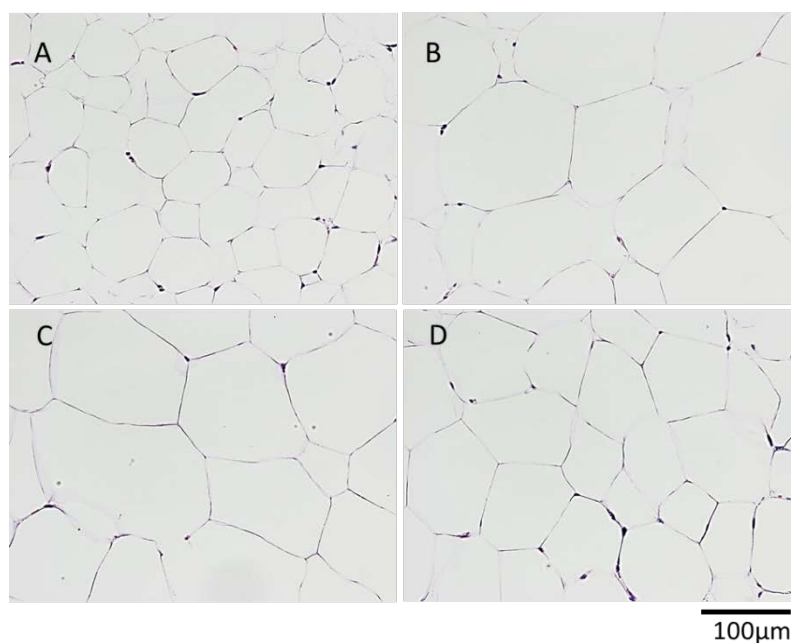


図 16 精巣上体周囲脂肪組織の光学顕微鏡像（ヘマトキシリン・エオジン染色）
各群の代表的な図を示した。L 群 (A), Ob 群 (B), DR 群 (C), DR+Ex 群 (D)。

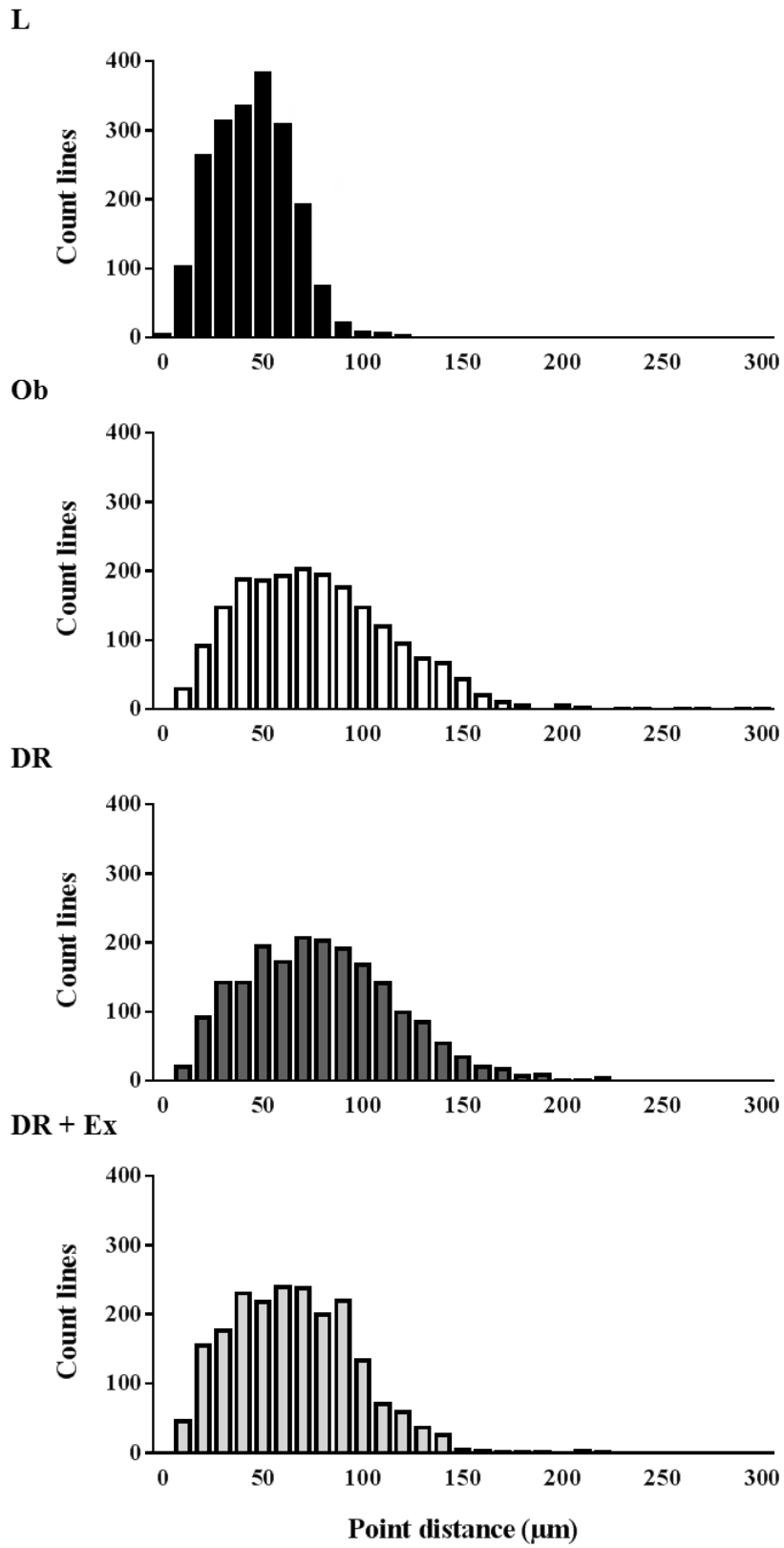


図 17 精巢上体脂肪組織の脂肪細胞サイズの分布
 交点間距離法により各群 2000 本測定した結果をヒストグラムで示した. n=3.

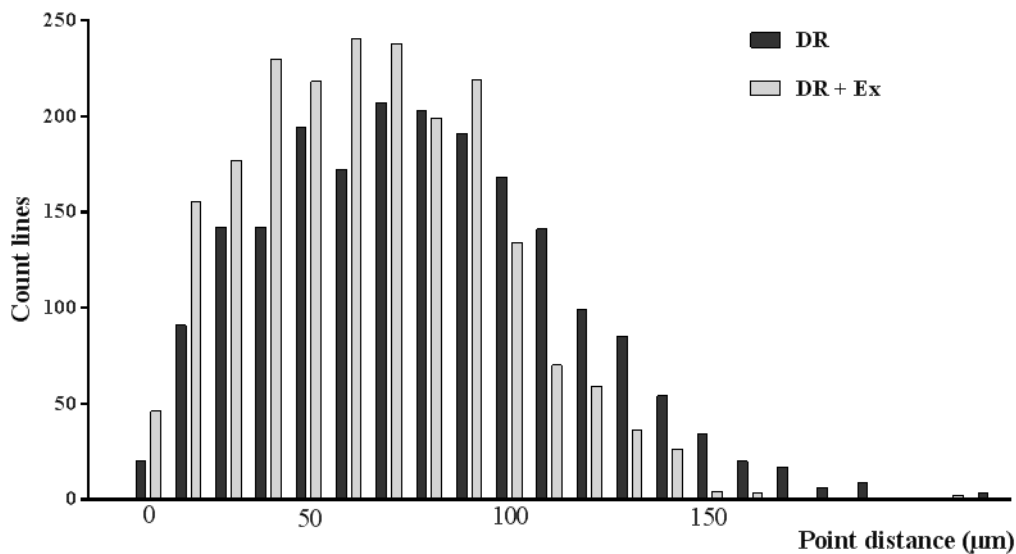


図 18 DR 群と DR+Ex 群の脂肪細胞サイズの分布の比較
 交点間距離法により各群 2000 本測定した結果のヒストグラムを DR 群と DR+Ex 群で比較した。黒い
 カラムが DR 群, 灰色のカラムが DR+Ex 群を示す。データは図 17 の再掲である。 n=3

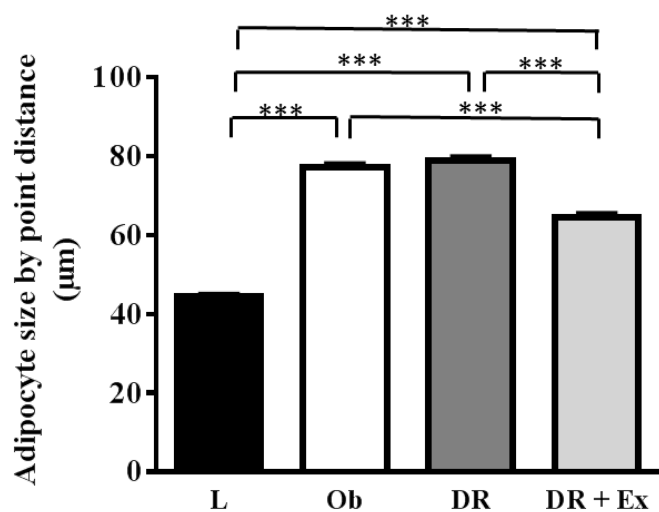


図 19 精巣上体脂肪組織の脂肪細胞サイズの平均
 交点間距離法により各群 2000 本測定した結果の平均値を示した。平均±標準誤差。***: $P < 0.001$
 平均±標準誤差, n=3.

(2) アディポネクチン

精巣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 ($P < 0.05$) (図 20)。

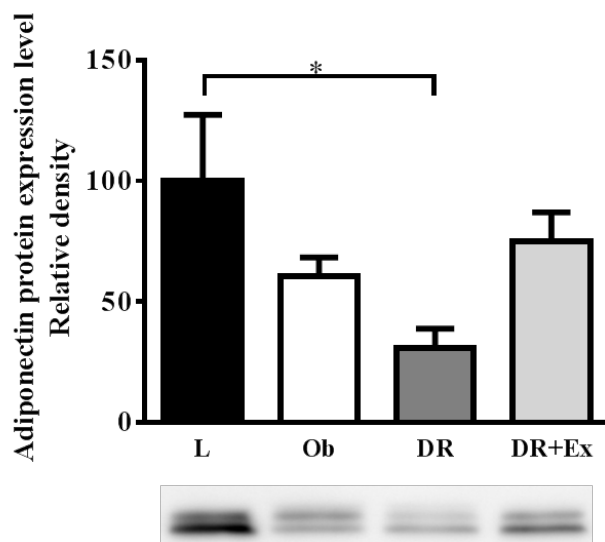


図 20 精巣上体脂肪組織アディポネクチンタンパク質発現量
L群を100とした時の相対値で示した。
*: $P < 0.05$ 平均±標準誤差, n=6

(3) ATGL, p-HSL, MAGL

精巣上体脂肪組織の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 ($P < 0.01$)。(図 21)

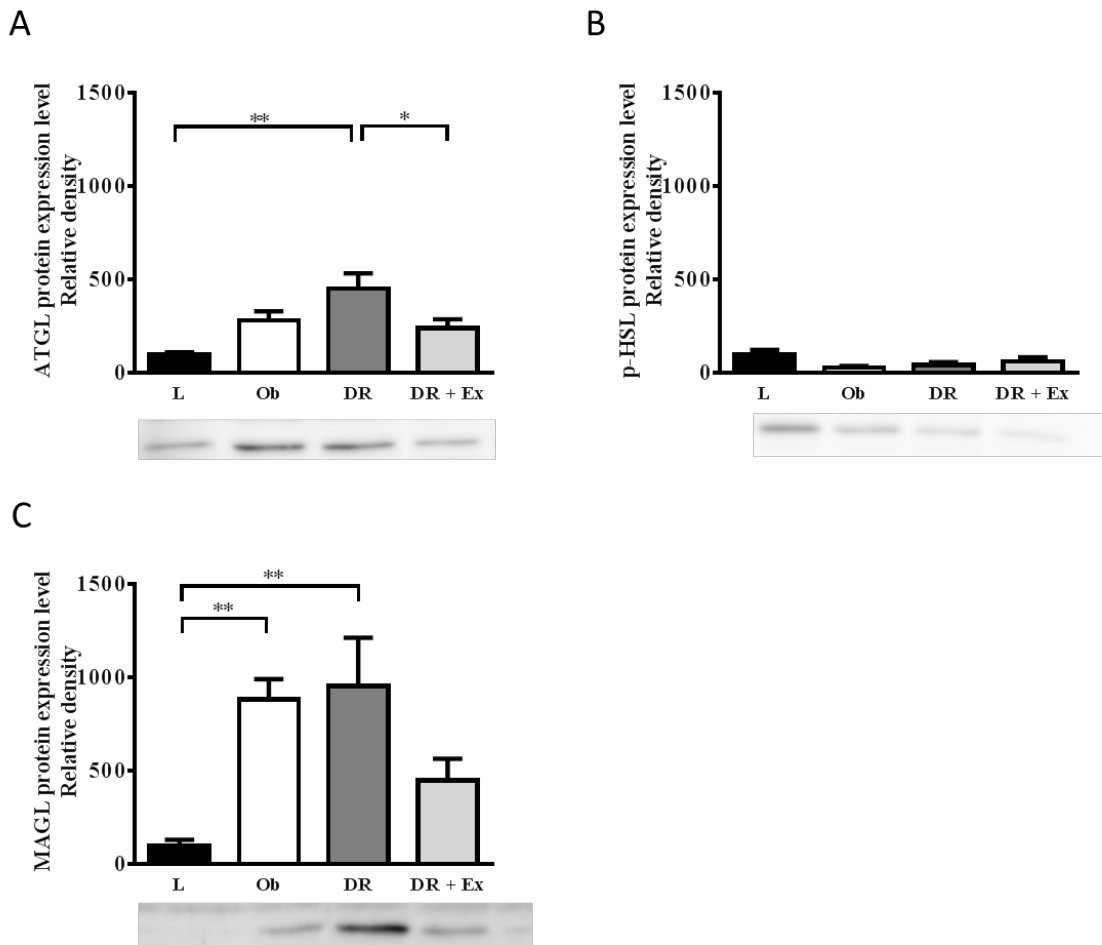


図 21 精巣上体脂肪組織 ATGL, p-HSL, MAGL タンパク質発現量

精巣上体脂肪組織の ATGL: Adipocyte triglyceride lipase (A), p-HSL: Phospho-hormone-sensitive lipase (B), MAGL: Monoacylglycerol lipase, (C) タンパク質発現量を L 群を 100 とした時の相対値で示した。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. 平均 ± 標準誤差, $n = 6$

第 4 節 考察

本研究では、ZF ラットに食餌制限を単独で実施することで肝脂肪蓄積が促進され、食餌制限と運動を併用することで肝脂肪蓄積が抑制されたことを明らかにした。また、血中レプチン濃度と血中 FFA 濃度は、食餌制限群で高値を示し、食餌制限+運動群では低値を示した。血中のレプチンと FFA は共に、脂肪組織から分泌され、特に大型の脂肪細胞から多く分泌されることがよく知られている^{123, 124}。血中レプチン濃度と血中 FFA 濃度は、それぞれ肝 TG 含有量の結果

と同じ傾向を示したことから、食餌制限と運動が肝脂肪蓄積に与える影響を説明するメカニズムの一つとして脂肪組織との関連が予想された。そこで、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。

(1) 肝脂肪蓄積と脂肪組織の脂肪細胞サイズ

ZF ラットは、肥満の進行に伴い脂肪細胞の極度な肥大が観察され、脂肪組織の炎症反応や悪玉アディポサイトカインの分泌の増加など、脂肪組織の機能的変化が生じていることで知られている^{123, 124)}。これらの脂肪組織の形態的・機能的変化は、全身のインスリン抵抗性やエネルギー代謝異常を惹起し、生活習慣病の要因となることから、近年ではこの脂肪組織の形態的・機能的変化は「脂肪毒性」と表現されている。ZF ラットは、脂肪細胞数の増加よりも脂肪細胞サイズの増加が顕著であり、脂肪組織の蓄積と脂肪細胞サイズの肥大は、およそ14週齢がピークであることが示されている³⁹⁾。

本研究では、先行研究^{123, 124)}と同様にZF ラットの脂肪細胞で明らかな肥大が確認された。その上で、食餌制限を実施しても脂肪細胞サイズの肥大は抑制されず、一方、食餌制限と運動習慣を組み合わせたことにより、脂肪細胞の肥大が有意に抑制された。脂肪細胞に対する運動の影響について、Miyazaki ら¹²⁵⁾は、運動により脂肪組織のレプチン mRNA 発現の減少が誘導されることを報告し、そのメカニズムの一つとして、脂肪細胞の大きさとの関連を指摘した。本研究の結果は、運動を実施させた食餌制限+運動群で、血中レプチン濃度の低下と脂肪細胞サイズの小型化を観察しており、Miyazaki ら¹²⁵⁾の報告と一致した。これらのことから、食餌制限群と食餌制限+運動群は、体重と脂肪組織重量が等しかったものの、脂肪組織の脂肪細胞の形態が異なることが明らかとな

り、食餌制限+運動群で観察された脂肪細胞肥大化の抑制効果は、運動習慣に起因したものであると考えられた。

Hoffstedt ら¹²⁰⁾は、肥満者の脂肪細胞の形態を調べ、大型の脂肪細胞を有する肥満患者（脂肪細胞肥大型肥満）と小型の脂肪細胞を多く有する肥満患者（脂肪細胞増殖型肥満）の代謝特性を比較したところ、グルコース、インスリン、脂質などの血中パラメータは脂肪細胞増殖型肥満でいずれも低値を示したことを報告した。本研究では、T-CHO、HDL-C、レプチン、FFA、AST、ALTの血中レベルは食餌制限群に比較し、食餌制限+運動群で低値であり、Hoffstedt ら¹²⁰⁾の報告と同様に脂肪細胞サイズが小さい食餌制限+運動群で、血中の脂質代謝状況が良好であった。さらに、本研究では、血中レベルの結果に加え、肝TG含有量も、脂肪細胞の肥大が抑制された食餌制限+運動群で低値であった。本研究では、肝TG含有量と脂肪細胞サイズの関係性を直接評価できていないが、肝TG含有量と血中レプチン濃度、並びに肝TG含有量と血中FFA濃度に強い正の相関関係を認めた。血中レプチン濃度の動態は、おおよそ脂肪細胞サイズを反映する指標として有効であることが知られている¹²⁵⁾。また、本研究の食餌制限群で低値であった脂肪組織アディポネクチンのタンパク質発現は、大型の脂肪細胞で発現が低下することが知られている¹²⁶⁾。これらのことを考慮すると、運動習慣により脂肪細胞の肥大化が抑制されたことが、肝脂肪蓄積の抑制に貢献した可能性が考えられた。

脂肪組織の脂肪蓄積状況は、他臓器の脂肪蓄積状況に影響を及ぼすことが報告されている^{119, 120)}。例えば、脂肪組織と肝脂肪蓄積との関連について、Shimomura ら¹²⁷⁾と Seip ら¹²⁸⁾は、脂肪萎縮症の病態では脂肪肝が観察されることを報告した。また、Wang¹²⁹⁾らは、db/db マウス（レプチン受容体欠損により過食や肥満症が生じる肥満モデル動物）に対して、脂肪組織の aPe-Lepr プロモーターに leptin receptor-b 遺伝子を導入することでレプチン受容体を過剰発現させた db/db トランスジェニックマウスを作成し、実験を行った。このトランス

ジェニックマウスでは、本来 db/db マウスに観察される脂肪組織の増加が明らかに抑制されていたが、同時に通常の db/db マウス以上に過剰な肝脂肪蓄積が確認された。さらに、Xia ら¹³⁰⁾は、高脂肪食摂取によって肥満になったマウスに対して、内視鏡的大網切除手術によって内臓脂肪を除去する実験を行った。その結果、切除したのは脂肪組織のみであったにも関わらず、脂肪肝が改善したことを報告した。これらの先行研究の共通点は、脂肪組織の脂肪蓄積の抑制と肝脂肪蓄積の亢進が同時に観察されたことである。このことから、脂肪萎縮症などの病的な要因や Wang ら¹²⁹⁾の研究のような遺伝子操作による脂肪組織への脂肪蓄積の抑制、または、肥満の進行による極度な脂肪組織への脂肪蓄積など、これ以上脂肪組織に脂肪を蓄積できない状況では、肝に脂肪蓄積が生じるというメカニズムが存在する可能性が推測された。一方、脂肪組織への脂肪蓄積が少ない状況や、Xia ら¹³⁰⁾の研究のように脂肪組織を除去した場合、または、脂肪組織の有する脂肪蓄積能力が大きい場合など、脂肪組織に脂肪を蓄積する余力が残っている状況では、肝への脂肪蓄積を回避できる可能性が考えられた。

先行研究では、脂肪細胞の肥大は、通常のサイズの3倍程度が限界であること¹³¹⁾、脂肪細胞への FFA の取り込みは同じ組織内では小さな脂肪細胞で優先的に生じていること¹³²⁾が示されており、脂肪細胞の肥大に限界点が存在すると考えられている。本研究の食餌制限群は、脂肪細胞の肥大化と過剰な肝脂肪蓄積が確認され、脂肪細胞の肥大が限界に達していた可能性が考えられた。その結果、脂肪細胞は脂肪を蓄積する余力を失い、脂肪肝が誘導されたのではないかと推察された。また、食餌制限+運動群では、運動習慣により脂肪細胞の肥大が抑制されたため、脂肪組織に脂肪を蓄積する余力が残されていた可能性が考えられた。その結果、食餌制限+運動群は、新たに蓄積すべき脂肪を脂肪組織に受け入れることが可能であり、肝脂肪蓄積につながらなかったのではないかと考えられた。この脂肪組織の脂肪蓄積能力に関する考察は、先行研究¹²⁷⁻¹³⁰⁾によって示唆された脂肪組織と肝脂肪蓄積との関係をサポートする可能性があ

る。しかしながら、現時点では、脂肪細胞の形態的・機能的変化と肝脂肪蓄積との因果関係を示すデータが不足しており、決定的な結論は出せない。この点については、今後の検討課題と考えている。

(2) 脂肪組織の機能 脂肪組織の脂肪分解能

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。本研究では、ZF ラットで観察される脂肪細胞の肥大化が食餌制限+運動群で抑制されたことを明らかにした。食餌制限群と食餌制限+運動群で脂肪細胞サイズに差が認められたことから、脂肪組織の性質的变化が生じていると予想された。第 2-1, 2-2 章では、血中 FFA 濃度の結果が、肝脂肪蓄積の結果を説明する可能性が示唆された。血中 FFA 濃度は、脂肪組織の脂肪分解能の直接的な影響を受けることが知られている。そこで、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、脂肪組織の脂肪分解能に着目して検討を行った。

通常、脂肪組織に蓄積された脂質は、TG として細胞内に存在している。脂肪細胞内の TG の分解に関しては、ATGL¹³³⁾, p-HSL¹³⁴⁾, MAGL¹³⁵⁾ が TG 分解の律速酵素として同定されている。TG は、ATGL によってジアシルグリセロールに分解され、さらに p-HSL によってモノアシルグリセロールに分解され、最後に MAGL によってグリセロールに分解されると考えられている¹³⁶⁾。また、この過程において、1 分子の TG から 3 分子の FFA が生じ、血中に分泌される¹³⁷⁾。本研究において、ATGL, p-HSL, MAGL の脂肪組織内タンパク質発現量を検討したところ、ATGL と MAGL は、食餌制限群で高値であり、一方、食餌制限+運動群では、発現が抑制されていた。このことから、脂肪組織の TG に対する分解反応は、食餌制限群で促進されていることが推察された。

肥大した脂肪細胞では、小型の脂肪細胞と比較し、脂肪分解反応が増強していることが知られている¹³⁸⁾。Laurencikiene ら¹³⁸⁾は、ヒトの皮下脂肪から得た

脂肪細胞を単離し、脂肪細胞の大きさごとに HSL や ATGL のタンパク質発現と脂肪分解速度を比較した。その結果、HSL や ATGL のタンパク質発現は、いずれも小型脂肪細胞より大型脂肪細胞で高値であった。加えて、この研究で、大型脂肪細胞は、細胞あたりの脂肪分解速度が小型脂肪細胞に比較し高いことが報告された。ATGL, p-HSL, MAGL のタンパク質発現の増加は、脂肪分解率および脂肪分解活性の増大を導くことが報告されている^{139, 140}。本研究は、肥満群と食餌制限群で脂肪組織 ATGL と MAGL の発現が増加しており、脂肪細胞の肥大化が生じた群で脂肪分解反応の亢進が確認された点で先行研究¹³⁸)の結果と一致した。

一方で、運動は、脂肪細胞サイズの肥大を抑制するにも関わらず、脂肪組織の脂肪分解反応を増強することが知られている¹⁴¹⁻¹⁴⁵。例えば、Huijsman ら¹⁴²)は、ATGL ノックアウトマウスと HSL ノックアウトマウスを用いて、運動の実施による脂肪組織の ATGL と HSL の働きを検討した。ワイルドタイプマウスは、疲労困憊運動後に血中遊離脂肪酸濃度の上昇が生じたのに対し、ATGL ノックアウトマウスと HSL ノックアウトマウスは共に、運動による血中 FFA 濃度の増加が抑制された。このことから、運動による脂肪分解反応の亢進には ATGL と HSL が両方とも重要な役割を果たしていることが報告された。また、Hashimoto ら¹⁴¹)と Ogasawara ら¹⁴⁵)は、習慣的な運動の実施により、脂肪組織の HSL や ATGL が増加したことを報告している。Hashimoto ら¹⁴¹)は、高スクロース食条件において、運動トレーニングを行うと脂肪組織中の HSL と ATGL のタンパク質発現量が増加したことを報告した。また、Ogasawara ら¹⁴⁵)は、Wister ラットに対する 9 週間のトレッドミル運動により脂肪組織の ATGL の mRNA 発現とタンパク質発現が増加することを報告した。このように、運動は、脂肪細胞サイズとは無関係に、脂肪分解反応を調節する作用が報告されている。

本研究の結果は、これらの運動による脂肪分解反応の亢進を示した先行研究¹⁴¹⁻¹⁴⁵)とは異なり、肥満群と食餌制限群に比較し、食餌制限+運動群で、脂肪組

織の ATGL と MAGL タンパク質発現が低値であった。したがって、本研究では、運動習慣による脂肪分解反応の亢進は確認されなかった。運動時の脂肪分解反応亢進のメカニズムの一つとして、運動時のカテコールアミン分泌の上昇による、HSL の活性化（リン酸化）が知られている¹⁴⁶⁾。しかしながら、運動時の血中カテコールアミン濃度の上昇は、運動強度に大きく影響されることが知られており¹⁴⁷⁾、低強度の運動では観察されないことが報告されている。本研究で食餌制限+運動群に実施させた運動は、運動習慣による体重への影響が生じない程度の運動量であった（第 2-1 章）。食餌制限+運動群の ATGL と MAGL のタンパク質発現は、脂肪細胞の肥大した状態（肥満群と食餌制限群）と比較すると脂肪分解反応が抑制されているものの、非肥満状態（非肥満群）と比較すると高値であった。運動による脂肪分解反応の促進は、エネルギー消費に伴うものであるのに対し、肥満群や食餌制限群で観察された ATGL や MAGL の発現増加は、脂肪細胞の脂肪蓄積能力の破綻によるものであると推測された。このことから、本研究の条件では、運動習慣による脂肪分解反応の促進が生じたものの、脂肪細胞の肥大による脂肪分解反応の亢進の方が大きく貢献した可能性が考えられた。

肝に蓄積される脂肪の約 60% は脂肪細胞で分解されて血中に分泌される FFA 由来であることが報告されている¹¹⁴⁾。したがって、脂肪細胞の脂肪分解反応の亢進による血中 FFA の増加は肝脂肪蓄積の増加に大きく影響すると考えられる。第 2-2 章において、食餌制限群では、血中 FFA 濃度の増加と肝 FAT/CD36 タンパク質発現の増加が確認され、一方、食餌制限+運動群では血中 FFA 濃度と肝 FAT/CD36 タンパク質発現の増加が抑制されたことが確認された。先行研究では、肝脂肪蓄積が生じるメカニズムの一つとして、脂肪組織の脂肪分解反応の亢進が、血中 FFA 濃度の増加を誘導し、さらに、この血中 FFA を FAT/CD36 の存在下で肝細胞内に取り込むことによって肝脂肪蓄積が生じることが示唆されている^{93, 94)}。このメカニズムに当てはめて考察すると、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、一般的に良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^{111, 148-152)}、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られなかった。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。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。

本研究の特徴は、ZFラットを用いた点と、食餌制限単独と食餌制限と運動の併用の2条件を同時に介入し、同じ体重で比較した点にある。本研究で使用し

た ZF ラットは、通常の飼育条件では、他の実験動物に比べ活動量が少ないことが報告されている⁶⁵⁾。そのため、食餌制限群は、低活動状態（運動不足）で、かつ、エネルギー摂取量が制限されたために肥満が抑制されたモデルとして、食餌制限+運動群は、運動不足状態を解消したモデルとして考えることが可能であった。そこで、ZF ラットによる食餌制限群と食餌制限+運動群の比較により、食事のみで肥満を抑制した場合と運動を取り入れながら肥満を抑制した場合の効果の違いを指摘し、運動不足が引き起こすリスクや肝脂肪蓄積の抑制に運動習慣が重要である理由を考察した。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。

本実験で得られた新たな知見の一つとして、ZF ラットの場合、食餌制限の実施により肝脂肪蓄積の増加が生じたことが挙げられる。食餌制限の実施により脂肪肝が進行したという本研究の結果は、他の肥満モデル動物を用いて同程度の食餌制限を行った先行研究^{84,85)}と比較しても他に例を見ない。極度の過食状態となる ZF ラットに対し、本研究の約 30%の食餌制限が飢餓状態に近い代謝状態を引き起こした可能性があり、それが肝脂肪蓄積の進行の要因となった可能性が推測された。今後、本研究の食餌制限群において、飢餓状態と共通した代謝的特徴の有無を確認することが求められる。

一方、ZF ラットは骨格筋の発達不良が生じていることや⁶⁴⁾、ZF ラットの食餌制限によって進行した脂肪肝は骨格筋の増量を伴う運動によって抑制された本研究の結果を考慮すると、運動不足と食餌制限の組み合わせにより肝脂肪蓄積が進行した可能性も考えられた。Hong ら¹⁵³⁾は、骨格筋の減少と脂肪肝のリスクが関連する可能性を報告した。DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry) 法とコンピュータによる断層撮影によって健常者とサルコペニア患者の肝を比較し、骨格筋量の少ないサルコペニア患者で高い脂肪肝リスクを示したことを明らかにした。骨格筋量の低下を抑制することが脂肪肝の予防・改善に有効で

あるとすれば、本研究のZFラットで観察された結果はそれを裏付けることになる。本研究で、食餌制限の実施により肝脂肪蓄積が促進した背景には、ZFラットの特徴である骨格筋の発達不足と活動量の低下が関連している可能性が考えられた。ZFラットは、慢性的に運動不足かつ骨格筋が発達不良のモデルとしても有効であると考えられ、ZFラットに自発走運動を負荷したことは、運動不足者が運動不足を解消することと近い現象を観察したのかもしれない。

本研究の限界点として、レプチンの受容体の変異という特徴を持つ疾患モデル動物を使用した点が挙げられる。ヒトにおけるレプチンの受容体の遺伝的変異^{87, 88)}は非常に稀であり、肥満の一般的な症状とは異なる。しかしながら、肥満が進行すると多くの者は、後天的にレプチン抵抗性の状態になることが知られている^{89, 154, 155)}。したがって、レプチン抵抗性状態が生じている点では、ZFラットも、肥満者も共通しており、本研究ではレプチン抵抗性状態での脂肪肝に対する運動の有効性を示したと考えている。また、運動を単独で実施させた群を設定していない点も本研究の限界である。食餌制限群と食餌制限+運動群の結果の違いについては、主に運動の有無による違いであると推測されたが、運動を単独で実施させた場合はどのような影響が生じるのかは本研究からは明らかではない。肝脂肪蓄積の抑制に関して、運動と食餌制限の併用が有効であるのか、あるいは、運動単独の実施であっても同様の効果が期待できるのか、については今後の検討課題である。

ヒトへの応用の可能性

本研究では、実験動物を用いた手法により、脂肪肝は肥満度とは独立して運動や食餌条件に影響される可能性があることを明らかにした。本研究の結果は、体重の増加を抑えられたとしても、生活習慣によっては必ずしも脂肪肝をはじめとした生活習慣病リスクを減らせる訳ではないことを指摘し、運動習慣や適切な食習慣が重要であることを示す科学的根拠の一つとなると考えられる。

近年、我が国では運動不足が問題となっていることに加え、エネルギー摂取量の減少傾向や、若齢者の痩せ願望の強い傾向などが問題視されている³⁾。ZFラットを用いた本研究は、このような我が国にみられる生活習慣の特徴を部分的に反映した。

まず、低活動状態を維持するZFラット⁶⁵⁾を用いたことにより、身体活動量が不足している者への運動の重要性についての示唆が可能であった。食餌制限+運動群に実施させた運動は自発的に行われたものであり、かつ、体重に影響を及ぼさない程度のものであったことから、身体を追い込むような激しい運動ではなく、日常生活の中で大きな負担なく実行できる程度のものに相当すると考えられた。特に、日常的に身体活動が不足している者にとっては、普段十分な運動を行っている者に比べ、低強度、短時間であっても運動を取り入れることの意義は大きい。本研究の結果は、その意義を示唆する一つの科学的知見であると考えられた。

また、本研究の結果は、食事コントロールのみに頼った体重コントロール方法の限界点を指摘した。若年女性を中心に、理想の体型を得るために食事量のコントロールに取り組む者が多い現状もあり、それが行き過ぎた場合には、健康障害に繋がる恐れが懸念される。実際に、本研究では食餌制限によって肥満を回避できたとしても、外見からはわからない組織レベル、細胞レベルにおいては病態が進行していた。これらの結果は、やせ願望や極度な食事制限に取り組む者に対しての過剰な食事制限によるリスクの理解を促す基礎資料として有効であると考えられた。さらに、肝脂肪蓄積の亢進が観察される低栄養状態²²⁾や拒食症患者¹⁵⁶⁾、脂肪萎縮症患者¹⁵⁷⁾への疾患治療研究において、運動が肝脂肪蓄積に及ぼした影響のメカニズムが、研究発展のための一助となり得る可能性が示唆された。

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。

謝辞

本研究を完了するにあたり、多くの先生方、大学院生の方にご協力をいただきました。

指導教員である本学総合生活研究科の湊久美子教授には、終始適切な助言を賜り、また丁寧にご指導いただきました。

本学総合生活研究科の金子健彦教授、人間総合科学大学の小林修平教授、本学総合生活研究科の柳澤幸江教授、鬘谷要教授、東京慈恵会医科大学の山内秀樹講師には、本論文の執筆にあたりご指導を賜りました。

また、金子健彦教授にはデータの解釈と論文作成にあたり、多くのご指導をいただきました。山内秀樹講師には、ウエスタブロード法のご指導とデータの解釈のための助言をいただきました。東邦大学医学部の澁谷和俊教授、大久保陽一郎助教には、組織学的な分析ならびにデータの解釈のご指導をいただきました。本学生命科学研究室の代谷陽子准教授には、組織学的データの解釈、および実験の遂行のためのご指導をいただきました。流通科学大学の北村裕美講師には、実験の遂行にご協力いただき、また、たくさんの励ましのお言葉をいただきました。本学運動生理学研究室の難波秀行助教には、研究の遂行にあたり有益な示唆をいただきました。同じく、同研究室大学院生の田中由佳里さん、村木美紀さん、本学総合生活研究科の皆様にはたくさんの励ましとご協力をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

なお、本論文の第2-2章、第2-3章は、日本学術振興会 科学研究費 研究課題番号:26870553 並びに 公益財団法人 明治安田厚生事業団 第29回健康医科学研究助成 によって遂行されました。深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 384, 766-781 (2014).
2. 吉池信男, 三好美紀 I. 概論 我が国における肥満・肥満症の疫学—諸外国との比較—. *日本臨床* 71, 208-216 (2013).
3. 厚生労働省 平成 25 年 国民健康栄養調査の結果
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000067890.html>. (2015 年 9 月 19 日)
4. 健康日本 21 評価作業チーム, 厚生労働省. 「健康日本 21」最終評価. (2011).
5. Blair, S.N., Kohl, H.W., 3rd, Paffenbarger, R.S., Jr., Clark, D.G., Cooper, K.H. & Gibbons, L.W. Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 262, 2395-2401 (1989).
6. Lee, C.D., Blair, S.N. & Jackson, A.S. Cardiorespiratory fitness, body composition, and all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *The American journal of clinical nutrition* 69, 373-380 (1999).
7. Shah, K., Stufflebam, A., Hilton, T.N., Sinacore, D.R., Klein, S. & Villareal, D.T. Diet and exercise interventions reduce intrahepatic fat content and improve insulin sensitivity in obese older adults. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17, 2162-2168 (2009).
8. Tamura, Y., Tanaka, Y., Sato, F., Choi, J.B., Watada, H., Niwa, M. *et al.* Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 3191-3196 (2005).
9. Larson-Meyer, D.E., Newcomer, B.R., Heilbronn, L.K., Volaufova, J., Smith, S.R., Alfonso, A.J. *et al.* Effect of 6-month calorie restriction and exercise on serum and liver lipids and markers of liver function. *Obesity* 16, 1355-1362 (2008).

10. Larson-Meyer, D.E., Redman, L., Heilbronn, L.K., Martin, C.K. & Ravussin, E. Caloric restriction with or without exercise: the fitness versus fatness debate. *Medicine and science in sports and exercise* 42, 152-159 (2010).
11. Ali, A.T. & Crowther, N.J. Body fat distribution and insulin resistance. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 95, 878-880 (2005).
12. Kelley, D.E., Goodpaster, B.H. & Storlien, L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annual review of nutrition* 22, 325-346 (2002).
13. Despres, J.P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881-887 (2006).
14. Goodpaster, B.H., Thaete, F.L., Simoneau, J.A. & Kelley, D.E. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 46, 1579-1585 (1997).
15. Kotronen, A., Yki-Jarvinen, H., Sevastianova, K., Bergholm, R., Hakkarainen, A., Pietilainen, K.H. *et al.* Comparison of the relative contributions of intra-abdominal and liver fat to components of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19, 23-28 (2011).
16. 水嶋春朔 我が国におけるメタボリックシンドロームに着目した特定健診・特定保健指導 (メタボリックシンドローム--病因解明と予防・治療の最新戦略)--(予防・治療・管理). *日本臨床* 64, 729-733 (2006).
17. Langin, D. In and out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. *Cell metabolism* 14, 569-570 (2011).
18. Cohen, J.C., Horton, J.D. & Hobbs, H.H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science (New York, N.Y.)* 332, 1519-1523 (2011).
19. Karagozian, R., Derdak, Z. & Baffy, G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Metabolism: clinical and experimental* 63, 607-617 (2014).
20. Kato, K., Takamura, T., Takeshita, Y., Ryu, Y., Misu, H., Ota, T. *et al.* Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic fatty liver disease. *PloS one* 9, e92170 (2014).
21. Sinn, D.H., Gwak, G.Y., Park, H.N., Kim, J.E., Min, Y.W., Kim, K.M. *et al.* Ultrasonographically detected non-alcoholic fatty liver disease is an independent

- predictor for identifying patients with insulin resistance in non-obese, non-diabetic middle-aged Asian adults. *The American journal of gastroenterology* 107, 561-567 (2012).
22. Lewis, B., Hansen, J.D., Wittman, W., Krut, L.H. & Stewart, F. Plasma free fatty acids in kwashiorkor and the pathogenesis of the fatty liver. *The American journal of clinical nutrition* 15, 161-168 (1964).
 23. Azuma, K., Kadowaki, T., Cetinel, C., Kadota, A., El-Saed, A., Kadowaki, S. *et al.* Higher liver fat content among Japanese in Japan compared with non-Hispanic whites in the United States. *Metabolism: clinical and experimental* 58, 1200-1207 (2009).
 24. Everhart, J.E. & Bambha, K.M. Fatty liver: think globally. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51, 1491-1493 (2010).
 25. Aleixandre de Artinano, A. & Miguel Castro, M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *The British journal of nutrition* 102, 1246-1253 (2009).
 26. Zucker, L.M. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 131, 447-458 (1965).
 27. Zucker, L.M. & Zucker, T.F. Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity* 52, 275-278 (1961).
 28. Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M. & Shima, K. Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochemical and biophysical research communications* 224, 597-604 (1996).
 29. Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M. & Shima, K. Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochemical and biophysical research communications* 222, 19-26 (1996).
 30. Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Stricker-Krongrad, A. & Jeanrenaud, B. The weight-reducing effect of an intracerebroventricular bolus injection of leptin in genetically obese fa/fa rats. Reduced sensitivity compared with lean animals. *Diabetes* 45, 1446-1450 (1996).

31. Yamashita, T., Murakami, T., Iida, M., Kuwajima, M. & Shima, K. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes* 46, 1077-1080 (1997).
32. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432 (1994).
33. Stern, J.S. & Johnson, P.R. Spontaneous activity and adipose cellularity in the genetically obese Zucker rat (fafa). *Metabolism: clinical and experimental* 26, 371-380 (1977).
34. Chua, S.C., Jr., Chung, W.K., Wu-Peng, X.S., Zhang, Y., Liu, S.M., Tartaglia, L. *et al.* Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science (New York, N.Y.)* 271, 994-996 (1996).
35. Zucker, L.M. & Antoniades, H.N. Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology* 90, 1320-1330 (1972).
36. Zucker, T.F. & Zucker, L.M. Hereditary Obesity in the Rat Associated with High Serum Fat and Cholesterol. *Experimental Biology and Medicine* 110, 165-171 (1962).
37. Zucker, T.F. & Zucker, L.M. Fat accretion and growth in the rat. *The Journal of nutrition* 80, 6-19 (1963).
38. Triscari, J., Greenwood, M.R. & Sullivan, A.C. Regulation of lipid synthesis in hepatocytes from lean and obese Zucker rats. *Metabolism: clinical and experimental* 30, 1135-1142 (1981).
39. Johnson, P.R., Zucker, L.M., Cruce, J.A. & Hirsch, J. Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *Journal of lipid research* 12, 706-714 (1971).
40. Fellmann, L., Nascimento, A.R., Tibirica, E. & Bousquet, P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & therapeutics* 137, 331-340 (2013).
41. Peterson, R.G., Shaw, W.N., Neel, M.-A., Little, L.A. & Eichberg, J. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR Journal* 32, 16-19 (1990).

42. Fink, A., Rufer, C.E., Le Grandois, J., Roth, A., Aoude-Werner, D., Marchioni, E. *et al.* Dietary walnut oil modulates liver steatosis in the obese Zucker rat. *European journal of nutrition* 53, 645-660 (2014).
43. Liu, Q., Berendsen, T., Izamis, M.L., Uygun, B., Yarmush, M.L. & Uygun, K. Perfusion defatting at subnormothermic temperatures in steatotic rat livers. *Transplantation proceedings* 45, 3209-3213 (2013).
44. Tarantola, E., Bertone, V., Milanese, G., Capelli, E., Ferrigno, A., Neri, D. *et al.* Dipeptidylpeptidase--IV, a key enzyme for the degradation of incretins and neuropeptides: activity and expression in the liver of lean and obese rats. *European journal of histochemistry : EJH* 56, e41 (2012).
45. Nativ, N.I., Yarmush, G., Chen, A., Dong, D., Henry, S.D., Guarrera, J.V. *et al.* Rat hepatocyte culture model of macrosteatosis: effect of macrosteatosis induction and reversal on viability and liver-specific function. *J Hepatol* 59, 1307-1314 (2013).
46. Kucera, O. & Cervinkova, Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World journal of gastroenterology : WJG* 20, 8364-8376 (2014).
47. Ran, J., Hirano, T. & Adachi, M. Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287, E227-232 (2004).
48. Dikdan, G.S., Saba, S.C., Dela Torre, A.N., Roth, J., Wang, S. & Koneru, B. Role of oxidative stress in the increased activation of signal transducers and activators of transcription-3 in the fatty livers of obese Zucker rats. *Surgery* 136, 677-685 (2004).
49. Buque, X., Cano, A., Miquilena-Colina, M.E., Garcia-Monzon, C., Ochoa, B. & Aspichueta, P. High insulin levels are required for FAT/CD36 plasma membrane translocation and enhanced fatty acid uptake in obese Zucker rat hepatocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 303, E504-514 (2012).
50. Chiba, T., Komatsu, T., Nakayama, M., Adachi, T., Tamashiro, Y., Hayashi, H. *et al.* Similar metabolic responses to calorie restriction in lean and obese Zucker rats. *Molecular and cellular endocrinology* 309, 17-25 (2009).

51. Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A.I. & Nieto, N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 136-138 (2005).
52. Yang, S.Q., Lin, H.Z., Lane, M.D., Clemens, M. & Diehl, A.M. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2557-2562 (1997).
53. Funakoshi, A., Miyasaka, K., Jimi, A., Kawanai, T., Takata, Y. & Kono, A. Little or no expression of the cholecystokinin-A receptor gene in the pancreas of diabetic rats (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty = OLETF rats). *Biochemical and biophysical research communications* 199, 482-488 (1994).
54. Bi, S. & Moran, T.H. Response to acute food deprivation in OLETF rats lacking CCK-A receptors. *Physiology & behavior* 79, 655-661 (2003).
55. Sanacora, G., Kershaw, M., Finkelstein, J.A. & White, J.D. Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127, 730-737 (1990).
56. Kalra, S.P., Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P. & Kalra, P.S. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10931-10935 (1991).
57. Beck, B., Bulet, A., Nicolas, J.P. & Bulet, C. Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in obese Zucker rats: implications in feeding and sexual behaviors. *Physiology & behavior* 47, 449-453 (1990).
58. Moran, T.H., Lee, P., Ladenheim, E.E. & Schwartz, G.J. Responsivity to NPY and melanocortins in obese OLETF rats lacking CCK-A receptors. *Physiology & behavior* 75, 397-402 (2002).

59. Thornhill, J.A., Taylor, B., Marshall, W. & Parent, K. Central, as well as peripheral naloxone administration suppresses feeding in food-deprived Sprague-Dawley and genetically obese (Zucker) rats. *Physiology & behavior* 29, 841-846 (1982).
60. Maggio, C.A., Haraczkiwicz, E. & Vasselli, J.R. Diet composition alters the satiety effect of cholecystokinin in lean and obese Zucker rats. *Physiology & behavior* 43, 485-491 (1988).
61. Azain, M.J., Hausman, D.B., Kasser, T.R. & Martin, R.J. Effect of somatotropin and feed restriction on body composition and adipose metabolism in obese Zucker rats. *The American journal of physiology* 269, E137-144 (1995).
62. Cleary, M.P. Consequences of restricted feeding/refeeding cycles in lean and obese female Zucker rats. *The Journal of nutrition* 116, 290-303 (1986).
63. Zheng, Y., Zhang, W., Pendleton, E., Leng, S., Wu, J., Chen, R. *et al.* Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese Zucker rats. *The Journal of endocrinology* 203, 337-347 (2009).
64. Schilder, R.J., Kimball, S.R., Marden, J.H. & Jefferson, L.S. Body weight-dependent troponin T alternative splicing is evolutionarily conserved from insects to mammals and is partially impaired in skeletal muscle of obese rats. *The Journal of experimental biology* 214, 1523-1532 (2011).
65. Towa, S., Kuwahara, M. & Tsubone, H. Characteristics of autonomic nervous function in Zucker-fatty rats: investigation by power spectral analysis of heart rate variability. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 53, 137-144 (2004).
66. Deb, S. & Martin, R.J. Effects of exercise and of food restriction on the development of spontaneous obesity in rats. *The Journal of nutrition* 105, 543-549 (1975).
67. Friedman, J.E., Sherman, W.M., Reed, M.J., Elton, C.W. & Dohm, G.L. Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS letters* 268, 13-16 (1990).

68. Saengsirisuwan, V., Kinnick, T.R., Schmit, M.B. & Henriksen, E.J. Interactions of exercise training and lipoic acid on skeletal muscle glucose transport in obese Zucker rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 91, 145-153 (2001).
69. Christ, C.Y., Hunt, D., Hancock, J., Garcia-Macedo, R., Mandarino, L.J. & Ivy, J.L. Exercise training improves muscle insulin resistance but not insulin receptor signaling in obese Zucker rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 92, 736-744 (2002).
70. Chang, S.P., Chen, Y.H., Chang, W.C., Liu, I.M. & Cheng, J.T. Merit of physical exercise to reverse the higher gene expression of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase in obese Zucker rats. *Life sciences* 79, 240-246 (2006).
71. Fiebig, R.G., Hollander, J.M., Ney, D., Boileau, R., Jeffery, E. & Ji, L. Training down-regulates fatty acid synthase and body fat in obese Zucker rats. *Medicine and science in sports and exercise* 34, 1106-1114 (2002).
72. Curioni, C.C. & Lourenco, P.M. Long-term weight loss after diet and exercise: a systematic review. *International journal of obesity (2005)* 29, 1168-1174 (2005).
73. Donnelly, J.E., Blair, S.N., Jakicic, J.M., Manore, M.M., Rankin, J.W. & Smith, B.K. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Medicine and science in sports and exercise* 41, 459-471 (2009).
74. Ishii, T., Yamakita, T., Yamagami, K., Yamamoto, T., Miyamoto, M., Kawasaki, K. *et al.* Effect of exercise training on serum leptin levels in type 2 diabetic patients. *Metabolism: clinical and experimental* 50, 1136-1140 (2001).
75. Shaw, K., Gennat, H., O'Rourke, P. & Del Mar, C. Exercise for overweight or obesity. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD003817 (2006).
76. Markovic, T.P., Jenkins, A.B., Campbell, L.V., Furler, S.M., Kraegen, E.W. & Chisholm, D.J. The determinants of glycemic responses to diet restriction and weight loss in obesity and NIDDM. *Diabetes care* 21, 687-694 (1998).
77. Christiansen, T., Paulsen, S.K., Bruun, J.M., Pedersen, S.B. & Richelsen, B. Exercise training versus diet-induced weight-loss on metabolic risk factors and inflammatory

- markers in obese subjects: a 12-week randomized intervention study. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298, E824-831 (2010).
78. Pons, S., Martin, V., Portal, L., Zini, R., Morin, D., Berdeaux, A. *et al.* Regular treadmill exercise restores cardioprotective signaling pathways in obese mice independently from improvement in associated co-morbidities. *Journal of molecular and cellular cardiology* 54, 82-89 (2013).
79. Delghingaro-Augusto, V., Decary, S., Peyot, M.L., Latour, M.G., Lamontagne, J., Paradis-Isler, N. *et al.* Voluntary running exercise prevents beta-cell failure in susceptible islets of the Zucker diabetic fatty rat. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302, E254-264 (2012).
80. Ostler, J.E., Maurya, S.K., Dials, J., Roof, S.R., Devor, S.T., Ziolo, M.T. *et al.* Effects of insulin resistance on skeletal muscle growth and exercise capacity in type 2 diabetic mouse models. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 306, E592-605 (2014).
81. 春日, 規., 山下, 晋., 小笠原, 仁., 鈴木, 英., 辻本, 尚. & 石原, 昭. 加負荷式回転車輪によるラットの自発走特性と骨格筋への効果. *体力科学* 48, 99-110 (1999).
82. Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. & Turner, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419 (1985).
83. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226, 497-509 (1957).
84. Rector, R.S., Uptergrove, G.M., Morris, E.M., Borengasser, S.J., Laughlin, M.H., Booth, F.W. *et al.* Daily exercise vs. caloric restriction for prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the OLETF rat model. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300, G874-883 (2011).
85. Fletcher, J.A., Meers, G.M., Laughlin, M.H., Ibdah, J.A., Thyfault, J.P. & Rector, R.S. Modulating fibroblast growth factor 21 in hyperphagic OLETF rats with daily

- exercise and caloric restriction. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 37, 1054-1062 (2012).
86. Friedman, J.M. & Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770 (1998).
87. Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J. *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908 (1997).
88. Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D. *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398-401 (1998).
89. Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H. *et al.* Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159-161 (1996).
90. Mainardi, M., Scabia, G., Vottari, T., Santini, F., Pinchera, A., Maffei, L. *et al.* A sensitive period for environmental regulation of eating behavior and leptin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16673-16678 (2010).
91. Bi, S., Scott, K.A., Hyun, J., Ladenheim, E.E. & Moran, T.H. Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in Otsuka long-evans Tokushima Fatty rats: role of hypothalamic signaling. *Endocrinology* 146, 1676-1685 (2005).
92. Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R. & Porter, J.W. Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods in enzymology* 35, 37-44 (1975).
93. Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B. *et al.* Liver lipid metabolism. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 92, 272-283 (2008).
94. Bradbury, M.W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290, G194-198 (2006).
95. Clugston, R.D., Yuen, J.J., Hu, Y., Abumrad, N.A., Berk, P.D., Goldberg, I.J. *et al.* CD36-deficient mice are resistant to alcohol- and high-carbohydrate-induced hepatic steatosis. *Journal of lipid research* 55, 239-246 (2014).

96. Koonen, D.P., Jacobs, R.L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.L., Ong, H. *et al.* Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 2863-2871 (2007).
97. Bechmann, L.P., Gieseler, R.K., Sowa, J.P., Kahraman, A., Erhard, J., Wedemeyer, I. *et al.* Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30, 850-859 (2010).
98. Goudriaan, J.R., Dahlmans, V.E., Teusink, B., Ouwens, D.M., Febbraio, M., Maassen, J.A. *et al.* CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *Journal of lipid research* 44, 2270-2277 (2003).
99. Coburn, C.T., Knapp, F.F., Jr., Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L. & Abumrad, N.A. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *The Journal of biological chemistry* 275, 32523-32529 (2000).
100. Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E. & Grimaldi, P.A. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *The Journal of biological chemistry* 268, 17665-17668 (1993).
101. Storch, J. & Thumser, A.E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1486, 28-44 (2000).
102. Stremmel, W., Strohmeyer, G., Borchard, F., Kochwa, S. & Berk, P.D. Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4-8 (1985).
103. Talanian, J.L., Holloway, G.P., Snook, L.A., Heigenhauser, G.J., Bonen, A. & Spriet, L.L. Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, E180-188 (2010).

104. Glatz, J.F., Luiken, J.J. & Bonen, A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological reviews* 90, 367-417 (2010).
105. Bonen, A., Parolin, M.L., Steinberg, G.R., Calles-Escandon, J., Tandon, N.N., Glatz, J.F. *et al.* Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1144-1146 (2004).
106. Bonen, A., Holloway, G.P., Tandon, N.N., Han, X.X., McFarlan, J., Glatz, J.F. *et al.* Cardiac and skeletal muscle fatty acid transport and transporters and triacylglycerol and fatty acid oxidation in lean and Zucker diabetic fatty rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297, R1202-1212 (2009).
107. Shiroya, Y., Umetsu, Y., Kitamura, H., Yamauchi, H. & Minato, K. Effects of exercise training and energy-restricted diet on fatty liver in Zucker fatty rats. *17th Annual Congress of the European College of Sport Science.*, 377 (2012).
108. Stefanovic-Racic, M., Perdomo, G., Mantell, B.S., Sipula, I.J., Brown, N.F. & O'Doherty, R.M. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 294, E969-977 (2008).
109. Rector, R.S., Thyfault, J.P., Uptergrove, G.M., Morris, E.M., Naples, S.P., Borengasser, S.J. *et al.* Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *Journal of hepatology* 52, 727-736 (2010).
110. Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Vitto, M.F., Luciano, T.F., Souza, D.R., Engelmann, J. *et al.* Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Life sciences* 91, 395-401 (2012).
111. Goncalves, I.O., Maciel, E., Passos, E., Torrella, J.R., Rizo, D., Viscor, G. *et al.* Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial

- activity in non-alcoholic steatohepatitis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 54, 163-173 (2014).
112. Sastre, J., Pallardo, F.V., Pla, R., Pellin, A., Juan, G., O'Connor, J.E. *et al.* Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 24, 1199-1205 (1996).
113. Diraison, F. & Beylot, M. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *The American journal of physiology* 274, E321-327 (1998).
114. Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D. & Parks, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* 115, 1343-1351 (2005).
115. Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porrás, J.A. & Auguet, T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and experimental gastroenterology* 7, 221-239 (2014).
116. Postic, C. & Girard, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 829-838 (2008).
117. Elshourbagy, N.A., Near, J.C., Kmetz, P.J., Sathe, G.M., Southan, C., Strickler, J.E. *et al.* Rat ATP citrate-lyase. Molecular cloning and sequence analysis of a full-length cDNA and mRNA abundance as a function of diet, organ, and age. *The Journal of biological chemistry* 265, 1430-1435 (1990).
118. Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Matsumura, Y., Nishimoto, N., Noguchi, T. *et al.* Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver. *European journal of biochemistry / FEBS* 190, 435-441 (1990).
119. Slawik, M. & Vidal-Puig, A.J. Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes & nutrition* 2, 41-45 (2007).

120. Hoffstedt, J., Arner, E., Wahrenberg, H., Andersson, D.P., Qvisth, V., Lofgren, P. *et al.* Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* 53, 2496-2503 (2010).
121. Knudsen, L., Weibel, E.R., Gundersen, H.J., Weinstein, F.V. & Ochs, M. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 108, 412-421 (2010).
122. Simon, D.M., Tsai, L.W., Ingenito, E.P., Starcher, B.C. & Mariani, T.J. PPARgamma deficiency results in reduced lung elastic recoil and abnormalities in airspace distribution. *Respiratory research* 11, 69 (2010).
123. Chakrabarti, S.K., Wen, Y., Dobrian, A.D., Cole, B.K., Ma, Q., Pei, H. *et al.* Evidence for activation of inflammatory lipoxygenase pathways in visceral adipose tissue of obese Zucker rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 300, E175-187 (2011).
124. Marques, B.G., Hausman, D.B. & Martin, R.J. Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *The American journal of physiology* 275, R1898-1908 (1998).
125. Miyazaki, S., Izawa, T., Ogasawara, J.E., Sakurai, T., Nomura, S., Kizaki, T. *et al.* Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. *Life sciences* 86, 691-698 (2010).
126. 阪上浩 アディポネクチンと脂肪細胞(大型, 小型), in アディポネクチンとその受容体-抗生活習慣病ホルモンの全貌. (ed. 森脇孝) 59-67 (フジメディカル出版, 大阪; 2008).
127. Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73-76 (1999).
128. Seip, M. & Trygstad, O. Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement* 413, 2-28 (1996).
129. Wang, M.Y., Grayburn, P., Chen, S., Ravazzola, M., Orci, L. & Unger, R.H. Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6139-6144 (2008).
130. Xia, L., Hua, J., Dray, X., Khashab, M.A., Liang, S., Kim, Y.S. *et al.* Endoscopic visceral fat removal as therapy for obesity and metabolic syndrome: a sham-controlled pilot study (with video). *Gastrointestinal endoscopy* 74, 637-644 (2011).
131. 杉原, 甫., 戸田, 修., 渡辺, 恵., 真鍋, 靖., 井手口, 浩., 中原, 慎. *et al.* 肥満についての, 新しい細胞生物学的分類の提唱. *肥満研究 : 日本肥満学会誌 = Journal of Japan Society for the Study of Obesity* 8, 125-130 (2002).
132. Rajjo, T.I., Harteneck, D.A. & Jensen, M.D. Direct Free Fatty Acid Storage in Different Sized Adipocytes from the Same Depot. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 22, 1275-1279 (2014).
133. Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (New York, N.Y.)* 306, 1383-1386 (2004).
134. Corbin, J.D., Reimann, E.M., Walsh, D.A. & Krebs, E.G. Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'- monophosphate-stimulated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 245, 4849-4851 (1970).
135. Tornqvist, H. & Belfrage, P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* 251, 813-819 (1976).
136. Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R. & Lass, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of lipid research* 50, 3-21 (2009).
137. Girisso, A. & Langin, D. Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *International journal of obesity (2005)* 36, 581-594 (2012).
138. Laurencikiene, J., Skurk, T., Kulyte, A., Heden, P., Astrom, G., Sjolín, E. *et al.* Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, E2045-2049 (2011).

139. Large, V., Arner, P., Reynisdottir, S., Grober, J., Van Harmelen, V., Holm, C. *et al.* Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells. *Journal of lipid research* 39, 1688-1695 (1998).
140. Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Girousse, A., Jocken, J. *et al.* Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 284, 18282-18291 (2009).
141. Hashimoto, T., Sato, K. & Iemitsu, M. Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 115, 260-267 (2013).
142. Huijsman, E., van de Par, C., Economou, C., van der Poel, C., Lynch, G.S., Schoiswohl, G. *et al.* Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 297, E505-513 (2009).
143. Nomura, S., Kawanami, H., Ueda, H., Kizaki, T., Ohno, H. & Izawa, T. Possible mechanisms by which adipocyte lipolysis is enhanced in exercise-trained rats. *Biochemical and biophysical research communications* 295, 236-242 (2002).
144. Ogasawara, J., Nomura, S., Rahman, N., Sakurai, T., Kizaki, T., Izawa, T. *et al.* Hormone-sensitive lipase is critical mediators of acute exercise-induced regulation of lipolysis in rat adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 400, 134-139 (2010).
145. Ogasawara, J., Sakurai, T., Kizaki, T., Ishibashi, Y., Izawa, T., Sumitani, Y. *et al.* Higher levels of ATGL are associated with exercise-induced enhancement of lipolysis in rat epididymal adipocytes. *PloS one* 7, e40876 (2012).
146. Horowitz, J.F. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14, 386-392 (2003).
147. Galbo, H., Holst, J.J. & Christensen, N.J. Glucagon and plasma catecholamine responses to graded and prolonged exercise in man. *Journal of applied physiology* 38, 70-76 (1975).
148. E, L., Lu, J., Burns, J.M. & Swerdlow, R.H. Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures. *Experimental physiology* 98, 207-219 (2013).

149. Johnson, N.A., Keating, S.E. & George, J. Exercise and the liver: implications for therapy in fatty liver disorders. *Seminars in liver disease* 32, 65-79 (2012).
150. Rector, R.S., Thyfault, J.P., Morris, R.T., Laye, M.J., Borengasser, S.J., Booth, F.W. *et al.* Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294, G619-G626 (2008).
151. Straznicky, N., Lambert, E., Grima, M., Eikelis, N., Nestel, P., Dawood, T. *et al.* The effects of dietary weight loss with or without exercise training on liver enzymes in obese metabolic syndrome subjects. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14, 139-148 (2012).
152. Yasari, S., Prud'homme, D., Wang, D., Jankowski, M., Levy, E., Gutkowska, J. *et al.* Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats. *Molecular and cellular biochemistry* 335, 291-299 (2010).
153. Hong, H.C., Hwang, S.Y., Choi, H.Y., Yoo, H.J., Seo, J.A., Kim, S.G. *et al.* Relationship between sarcopenia and nonalcoholic fatty liver disease: the Korean Sarcopenic Obesity Study. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59, 1772-1778 (2014).
154. Pan, H., Guo, J. & Su, Z. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiology & behavior* 130, 157-169 (2014).
155. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nye, M.R. *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine* 334, 292-295 (1996).
156. Mehler, P.S. & Brown, C. Anorexia nervosa - medical complications. *Journal of eating disorders* 3, 11 (2015).
157. Ebihara, K., Kusakabe, T., Hirata, M., Masuzaki, H., Miyanaga, F., Kobayashi, N. *et al.* Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 532-541 (2007).