慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	若齢期の食・運動が成熟期の骨格筋・褐色・白色脂肪の代謝関連遺伝子に及ぼす長期効果
Sub Title	Long term effects of diet and exercise in childhood on metabolism related gene expression in skeletal muscle, brown and white adipose tissue of adult mice
Author	木村, 真規(Kimura, Masaki)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、若齢期の食習慣および運動習慣が成熟期の骨格筋・白色脂肪組織の代謝関連遺伝子の発現変化に及ぼす長期的 (レガシー) 効果についてマウスを用いた基礎的検討を行った。 本研究の結果、若齢期の肥満および運動経験によって長期的に変化する遺伝子は、白色脂肪組織と比較して骨格筋組織では約半分程度であり、レガシー因子の候補が少ない可能性が示唆された。また若齢期に遊具などが設置された社会的に豊かな環境で飼育を行ったところ、活動量や体温に上昇傾向がみられたものの、筋力には影響がみられなかったことから、より効果的な環境を整備することを目的として、今後更なる検討を進める必要性が感じられた。 There is little evidence what the diet and exercise in childhood will effect on adult. The purpose of this study was to investigate the long term effects of diet and exercise in childhood on metabolism related gene expression in skeletal muscle and white adipose tissue of adult mice. Our results suggested that the long term effects of diet and exercise in childhood on the gene expression in skeletal muscle is about half compared to that in adipose tissue, that means there may be only a weak legacy effect on the gene expression in skeletal muscle. The environmental enrichment in childhood brought increase tendencies in physical activity and body temperature, but there was no effect in muscle strength. These data suggested that the further investigation is needed to create a more effective environment in childhood.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2016 ~ 2018 課題番号 : 16K01831 研究分野 : 生理学 , 運動生理学 , 病態生理学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K01831seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　６ 月 １１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０１８３１

研究課題名（和文）若齢期の食・運動が成熟期の骨格筋・褐色・白色脂肪の代謝関連遺伝子に及ぼす長期効果

研究課題名（英文）Long term effects of diet and exercise in childhood on metabolism related gene expression in skeletal muscle, brown and white adipose tissue of adult mice

研究代表者

木村　真規（KIMURA, Masaki）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・講師

研究者番号：４０３８３６６６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では，若齢期の食習慣および運動習慣が成熟期の骨格筋・白色脂肪組織の代謝関連遺伝子の発現変化に及ぼす長期的(レガシー)効果についてマウスを用いた基礎的検討を行った．
　本研究の結果，若齢期の肥満および運動経験によって長期的に変化する遺伝子は，白色脂肪組織と比較して骨格筋組織では約半分程度であり，レガシー因子の候補が少ない可能性が示唆された．また若齢期に遊具などが設置された社会的に豊かな環境で飼育を行ったところ，活動量や体温に上昇傾向がみられたものの，筋力には影響がみられなかったことから，より効果的な環境を整備することを目的として，今後更なる検討を進める必要性が感じられた．

研究成果の学術的意義や社会的意義
　本研究はマウスを用いた基礎的研究ではあるが，得られた結果を精査することによって，ヒトへの応用展開に対してある一定の知見を提供すことが可能と考えている．本研究の結果を広義に解釈することによって，子供の頃(若齢期)の食習慣および運動習慣が成人後(成熟期)の骨格筋や脂肪組織の機能に対して長期的に影響を及ぼす可能性が示され，その影響の強さは各組織によって異なる可能性が示唆された．
　また行動範囲が広く活動内容に多様性があり他者と接する機会の多い社会的に豊かな環境での生活は，身体活動量や基礎代謝を増加させる可能性があるが，より効果的な環境を整備する為には今後も更なる検討が必要と思われた．

研究成果の概要（英文）：　There is little evidence what the diet and exercise in childhood will effect on adult. The purpose of this study was to investigate the long term effects of diet and exercise in childhood on metabolism related gene expression in skeletal muscle and white adipose tissue of adult mice.
　Our results suggested that the long term effects of diet and exercise in childhood on the gene expression in skeletal muscle is about half compared to that in adipose tissue, that means there may be only a weak legacy effect on the gene expression in skeletal muscle. The environmental enrichment in childhood brought increase tendencies in physical activity and body temperature, but there was no effect in muscle strength. These data suggested that the further investigation is needed to create a more effective environment in childhood.

研究分野：生理学，運動生理学，病態生理学

キーワード：長期的効果　運動習慣　食習慣　高脂肪食　骨格筋　白色脂肪　豊かな環境　レガシー効果

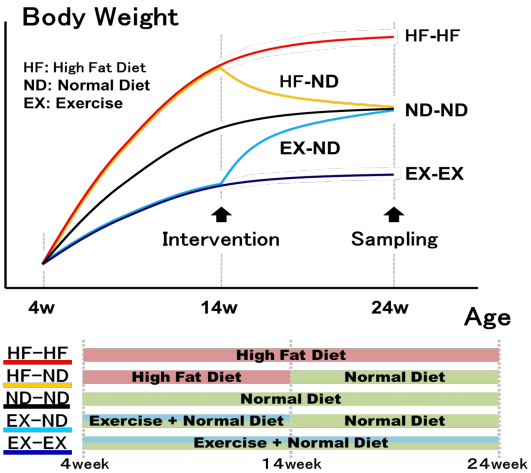
様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

(1)　これまで我々は，厳格な食事療法，運動療法，薬物療法の実施によって，実験的環境下では肥満症やメタボリックシンドロームは改善可能であることを報告してきた(Kimura ら 2006, Shinozaki ら 2008)．しかし，実際の臨床現場では肥満後に長期に亘って適正体重を達成･維持できる者は少なく，多くの者が治療抵抗性を示している(Pirozzo ら 2003)．また我々の先行研究では，高脂肪食摂取による若齢期の肥満は，その後の食生活の改善によっても完全には是正されず，体脂肪量，血糖，血清脂質がいずれも高値となること見出した(摂餌量や活動量に差は認められない．この現象は，あたかも肥満状態が新しいエネルギーバランスのセットポイントとして記憶されているかのようであり，過去の肥満経験が何らかの因子を活性/抑制することによって，食生活改善後においても脂肪の蓄積を積極的に維持し，糖･脂質代謝異常を誘起している可能性が示唆された(肥満経験による負の長期的(レガシー)効果)．

(2)　また我々は，過食性肥満モデルラットに対する若齢期の運動習慣がその後の成熟期･老齢期においても低めの体重を維持する現象を報告した(鈴木ら 2007)．この場合においては摂餌量や活動量に変化は認められないにも拘わらず，体脂肪量や糖･脂質代謝は良好な状態を維持していたことから，過去の運動経験によっても何らかの因子が変化することによって，成熟期･老齢期において脂肪の蓄積を抑制し，糖･脂質代謝を良好に維持する可能性が示唆された(運動経験によるレガシー効果，食事制限ではこの効果はみられない)．

(3)　我々の先行研究では，これらのレガシー効果の観察された白色脂肪組織中に発現する遺伝子の網羅的解析を行ったところ，PGC-1α や UCP-1，β3 アドレナリン受容体などの熱産生系遺伝子が運動によって長期間変化する現象が観察された．これらの遺伝子は通常，骨格筋や褐色脂肪組織などの熱産生組織で強く発現が誘導される遺伝子であることから，運動経験によるレガシー効果はこれらの組織でもより強く観察される可能性が示唆された．



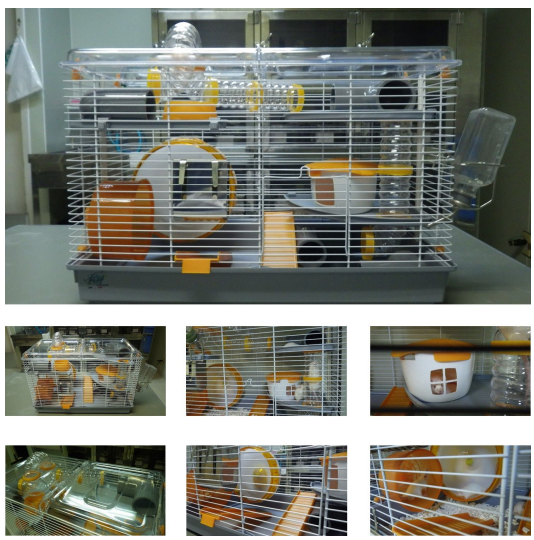
２．研究の目的

(1)　本研究では，若齢期の食･運動習慣がその後の成熟期･老齢期に及ぼすレガシー効果とその機序について，骨格筋，褐色および白色脂肪組織中に発現するエネルギー代謝関連遺伝子の変化から明らかにすることを試みる．

(2)　そこで本研究では，①若齢期の肥満･運動経験によって長期間変化するエネルギー代謝関連遺伝子の網羅的発現解析，②老齢期の健康･長寿を導く若齢期の生活環境(豊かな環境)の探索，の 2 点について検討を行った．

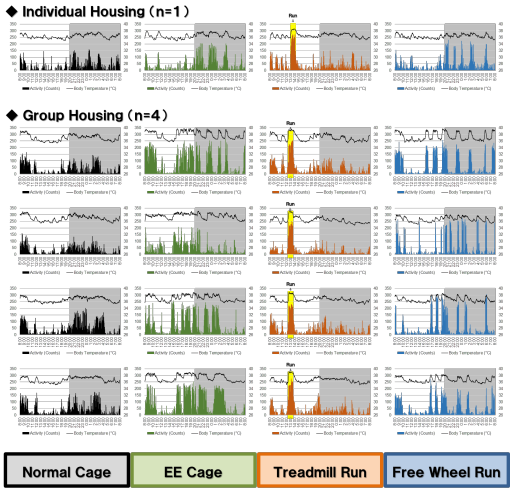
３．研究の方法

(1)対象および飼育方法



まず検討①として，3 週齢の雄性 ICR マウス(40 匹)を対象に，普通食(CE-2，日本クレア)にて集合ケージ(15×12×21cm/4 匹)を用いた 1 週間の予備飼育を行った．4 週齢時に個別ケージ(8×8×21cm)に移動させ，平均体重が一致するように以下の 5 つに群分けをした．1) 普通食(ND-ND)群：4 週齢より普通食を与えて 24 週齢時にサンプリングを行った．2) 高脂肪食(HF-HF)群：4 週齢より高脂肪食(Quick Fat，日本クレア)を与えて 24 週齢時にサンプリングを行った．3) 高脂肪食→普通食(HF-ND)群：4 週齢より高脂肪食を与えて 14 週齢まで飼育した．14 週齢時に高脂肪食を普通食へ変更し，24 週齢まで飼育してサンプリングを行った．4) 運動(EX-EX)群：4 週齢より回転ホイール(周囲長 67cm，幅 5cm)付の個別ケージ(8×8×21cm)を用いて 24 週齢まで自発運動が可能な環境で飼育した．餌は普通食とした．5) 運動→普通食(EX-ND)群：4 週齢より回転ホイール付個別ケージを用いて 14 週齢まで飼育した．14 週齢時に回転ホイールにアクセスできないように敷居扉を閉鎖して運動を中止し，24 週齢まで飼育してサンプリングを行った．餌は普通食とした．

次に検討②として，3 週齢の雄性 ICR マウス(16 匹)を対象に，普通食(CE-2，日本クレア)にて集合ケージ(15×12×21cm/4 匹)を用いた 1 週間の予備飼育を行った．4 週齢時に平均体重が一致するように 2 つに群分けし，環境エンリッチメント(EE)条件(約 56×30×38cm の大型ケージ内に回転ホイールやトンネル，梯子，隠れ家などの遊具を設置)での飼育と，普通ケージ(CO：約 30×20×12cm)での飼育で比較を行った．24 週齢時に握力測定，Beam 歩行試験，Escape 試験を実施した．また EE 条件下での飼育環境について評価する為に，マウス(n=4)の腹腔内に体内埋め込み型の小型メモリ計測器である Nano Tag を埋め込んで活動量と体温を昼夜連続的に計測し，CO，EE，トレッドミルトレーニング(TR)，回転ケージ(WR)条件において普通餌で飼育して比較を行った．TR ではトレッドミルを用いた 20m/min×5%傾斜×30 分間と 25m/min×5%傾斜×30 分間のトレーニングを 5 分間の休息を挟んで実施した．トレーニングは明期の同時刻に実施し，普通ケージで飼育した．



(2)サンプリングおよび解析方法

各種のモデル動物作成後，イソフルラン吸入麻酔下(～5%)にて腹部下大静脈からの全血採血を行った．得られた血液は遠心分離後，上清を-80℃で保存して，後日，糖・脂質マーカーの測定を行った．また下肢骨格筋(前脛骨筋，長趾伸筋，腓腹筋，ヒラメ筋，足底筋)および各種脂肪組織(褐色脂肪，副睾丸周囲脂肪，後腹膜脂肪) を摘出して秤量し，ドライアイスにて急速凍結し，-80℃で保存した．得られた組織から RNeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN 社)を用いて Total RNA を抽出し，cDNA 化して Agilent Technologies 社の SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray を用いて網羅的遺伝子発現データを解析して候補遺伝子の選出を行った．DNA マイクロアレイ解析を行った検体は HF-HF 群，ND-ND 群，EX-EX 群においては体重が群内平均に最も近い個体を，HF-ND 群および EX-ND 群においては ND-ND 群から選抜された個体の体重に最も近い個体を対象とした(全部で n=5 を選抜)．その後，DNA マイクロアレイ解析によって選出された肥満・運動記憶因子の候補遺伝子を Realtime-PCR 法にて定量評価した．

４．研究成果

(1)　骨格筋および白色脂肪組織を対象とした約 3 万個の遺伝子の網羅的発現解析では，若齢期の肥満・運動経験によって長期的に変化するレガシー因子の候補として，白色脂肪組織では約 3,000 個の遺伝子が見出されたのに対して，骨格筋組織では約 1,500 個と約半分程度であり，白色脂肪組織と比較して骨格筋組織では遺伝子発現におけるレガシー因子の候補が少ない可能性が示唆された．またレガシー因子の候補としては，予想されたエネルギー代謝系の遺伝子の他，老化関連遺伝子などにも候補としての高い可

◆ Individual Housing（n=1）

Activity（Counts）	Whole Day（08:00～07:59）		Day Time（08:00～19:59）		Night Time（20:00～07:59）	
	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max
Normal Cage	16.4±30.7	174	12.3±28.3	174	20.5±33.7	159
EE Cage	20.4±36.7	207	13.3±27.1	164	27.5±43.0	207
Treadmill Run	19.6±46.5	272	27.3±60.6	272	11.8±23.2	150
Free Wheel Run	19.2±39.0	230	14.9±31.1	218	23.5±45.2	230

Body Temperature（℃）	Whole Day（08:00～07:59）		Day Time（08:00～19:59）		Night Time（20:00～07:59）	
	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max
Normal Cage	36.3±0.5	37.7	36.0±0.5	37.6	36.7±0.6	37.7
EE Cage	36.4±0.8	38.1	36.1±0.7	38.1	36.7±0.7	38.1
Treadmill Run	36.6±0.7	38.6	36.5±0.8	38.6	36.6±0.6	37.6
Free Wheel Run	36.3±0.7	38.3	36.0±0.8	38.3	36.5±0.5	37.7

◆ Group Housing（n=4）

Activity（Counts）	Whole Day（08:00～07:59）		Day Time（08:00～19:59）		Night Time（20:00～07:59）	
	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max
Normal Cage	17.6±5.9	164.8±28.5	14.6±2.3	154.3±17.1	20.7±10.3	164.0±29.4
EE Cage	35.3±13.2 a	250.0±28.2 aa	39.6±11.6 a	247.0±26.5 aa	31.0±15.7	235.3±28.0 a
Treadmill Run	21.0±3.5	252.8±17.7 aa	32.7±6.0 aa	252.8±17.7 aaa	9.3±2.6	128.5±15.9 bbb
Free Wheel Run	25.5±4.6	276.8±21.4 aaa	26.8±8.8 a	275.5±20.6 aaa	24.2±5.0 cc	259.3±38.9 aa,ccc

Body Temperature（℃）	Whole Day（08:00～07:59）		Day Time（08:00～19:59）		Night Time（20:00～07:59）	
	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max	Mean±SD	Max
Normal Cage	36.8±0.2	38.5±0.5	36.5±0.2	38.5±0.5	37.0±0.1	38.3±0.3
EE Cage	37.5±0.3 aa	39.2±0.5	37.6±0.4 aa	39.2±0.5	37.3±0.3	39.1±0.5 a
Treadmill Run	36.7±0.3 b	39.3±0.3 a	36.9±0.3 b	39.3±0.3 a	36.5±0.3 a,b	38.1±0.4 b
Free Wheel Run	36.8±0.3 b	38.7±0.7	36.8±0.4 b	38.7±0.8	36.9±0.3	38.5±0.8

◆ Effects of EE for 20 weeks（n=8）

Group	Body Weight（g）	Food Intake（g/day）	Grip Strength（kgf）	Beam Walk（sec）	Escape Time（sec）
Normal Cage	47.6±3.8	5.70±0.57	0.150±0.018	3.160±1.050	103.9±39.2
EE Cage	46.9±3.4	7.21±0.56	0.146±0.016	1.748±0.675 aa	1.9±1.1 aaa

能性が示唆された．しかし今回，褐色脂肪組織についてはサンプルのコンディションが悪く，抽出した Total RNA の品質が十分でなかったことから解析することが出来なかった．今後，追加実験を含めて更なる検討を進める予定である．

(2) また，遊具などが設置された社会的に豊かな EE 環境で飼育を行ったところ，活動量や体温に上昇傾向がみられ，その効果は単独飼育と比較して集団飼育でより顕著であった．またバランス歩行能力や跳躍力などは EE 環境で有意な増加がみられたが,筋力には影響はみられなかった．また当初の予想と反して，EE 環境での飼育では「喧嘩」や「いじめ」のような行動が観察され，これらが原因と思われる個体の死亡(8 匹中 2 匹)もみられたことから，今後より効果的な環境を整備することを目的として更なる検討を進める必要性が感じられた．

＜引用文献＞

① Masaki Kimura, Tomokazu Shinozaki, Naoto Tateishi, Emi Yoda, Hideki Yamauchi, Masato Suzuki, Makoto Hosoyamada, Toshiaki Shibasaki (2006) Adiponectin is regulated differently by chronic exercise than by weight-matched food restriction in hyperphagic and obese OLETF rats. Life Sciences, 79: 2105-2111.

② Tomokazu Shinozaki, Masaki Kimura, Makoto Hosoyamada, Toshiaki Shibasaki. (2008) Fluvoxamine inhibits weight gain and food intake in food restricted hyperphagic Wistar rats. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 31(2): 2250-2254.

③ Pirozzo S, Summerbell C, Cameron C, Glasziou P. (2003) Should we recommend low-fat diets for obesity?. Obesity Review, 4(2):83-90.

④ Masato Suzuki, Daisuke Shindo, Masaki Kimura, Hidefumi Waki. (2011) Effects of exercise, diet, and their combination on metabolic- syndrome- related parameters in OLETF rats. International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism, 21(3):222-232.

⑤ Masaki Kimura. (2013) Genes and molecules related to obesity and lifestyle-related disease and exercise. The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 2:111-115.

５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計 3 件）

① 木村真規，柴川 涼，松本吉弘，齋藤義正，齋藤英胤（2019） 個別および集団飼育におけるマウスの活動量および体温変化に及ぼす環境エンリッチメントの影響． 第 74 回日本体力医学会大会（茨城）

② Masaki KIMURA, Risako ISHII, Natsumi HIRANO, Ryoei UCHIDA, Yoshimasa SAITO, Hidetsugu SAITO (2018) Effects of Environmental Enrichment on Physical Activity and Body Temperature in Mice. 23th Annual Congress of the European College of Sport Science (ECSS) (Dublin, Irland)

③ 木村真規，石井里沙子，平野菜摘，内田諒英，齋藤義正，齋藤英胤（2017） 環境エンリッチメントがマウスの活動量および体温変化に及ぼす影響． 第 72 回日本体力医学会大会(愛媛)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。