

# 博士学位論文審査要旨

2016年2月14日

論文題目：Mechanisms of circadian regulation of exercise training-enhanced lipolysis  
in rat adipocytes  
(ラット脂肪細胞における運動トレーニングによる脂肪分解反応増強作用の  
サーカディアン性調節機構)

学位申請者：加藤 久詞

審査委員：

主査： スポーツ健康科学研究科 教授 井澤 鉄也  
副査： スポーツ健康科学研究科 教授 柳田 昌彦  
副査： スポーツ健康科学研究科 教授 北條 達也

要旨：

肥満を基盤とする生活習慣病の増加が近年の大きな社会問題となっている。肥満は脂肪細胞の肥大と増殖に規定され、脂肪細胞の肥大や増殖異常は脂肪組織の慢性的炎症やアディポカインの分泌異常を引き起こす。さらに、脂肪細胞の代謝調節機構やアディポカインの分泌には中枢性あるいは脂肪細胞の時計遺伝子に支配されるサーカディアンリズム（概日リズム）が見られ、概日リズムの乱れが脂肪細胞の生物学的機能の破綻に結びつくことが明らかになってきた。したがって、肥満を基盤とする生活習慣病の予防や改善を目的とした運動療法はもとより、食事療法や薬物療法も脂肪細胞の概日リズムを考慮して設計されなければならない。しかしながら、脂肪細胞の時計遺伝子発現を修飾する内因性因子や時計遺伝子発現リズムと代謝の関係には未解明な部分が数多く残され、脂肪細胞の概日リズムを考慮した運動療法の開発には至っていない。

本論文は、概日リズムの内因性調節因子として松果体ホルモンのメラトニンに着目し、メラトニンの脂肪前駆細胞の分化と成熟脂肪細胞の代謝（脂肪分解反応）に及ぼす影響を明らかにして、メラトニンの肥満症治療への応用性を示唆している。さらに、時計遺伝子発現リズムと血中メラトニン濃度を考慮した運動療法（運動トレーニング）の脂肪細胞の生理機能に及ぼす影響を検討している。著者は、血中メラトニン濃度が脂肪細胞の時計遺伝子 *bmal1* 発現ピーク時に高く、*bmal1* 発現ボトム時に低くなることを確認し、*bmal1* 発現ピーク時に行った運動トレーニングが *bmal1* 発現ボトム時の運動トレーニングに比較して、脂肪細胞の脂肪分解反応を有意に亢進させ、体重および脂肪組織重量の増加抑制に繋がることを明確にしている。

本論文は4章で構成されている。第1章では、本論文の研究背景となる内外の文献を詳細にレビューすることで、当該分野の研究動向と研究課題を具体的かつ包括的に纏め、本論文の目的を明確にしている。第2章では、脂肪前駆細胞（3T3-L1細胞）の分化と成熟脂肪細胞の代謝（脂肪分解反応）に及ぼすメラトニンの影響を免疫組織学的ならびに生化学的手法で検討している。そ

の結果、脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化に際して、メラトニンは種々の脂肪細胞分化マーカーの mRNA 発現を増加させ、ミトコンドリアの著しい新生を伴った小型の成熟脂肪細胞に分化させることを見いだしている。また、脂肪分解反応に関わる種々のタンパク質発現量がメラトニンによって有意に増加し、アゴニストによる脂肪分解反応の亢進も同時に起こる事を示している。加えて、成熟脂肪細胞のアディポネクチン分泌もメラトニンによって有意に促進することを明らかにしている。こうしたメラトニンの作用は、脂肪細胞の運動トレーニングに対する適応現象と酷似している。さらに、メラトニンの作用機序は抗糖尿病薬 (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  アゴニスト) の作用機序とも類似しており、メラトニンの肥満症治療への応用性を強く示唆している。第3章では、血中メラトニン濃度が高くなる時点で行った運動トレーニングの効果を詳細に検討している。血中メラトニン濃度には概日リズムが見られ、脂肪細胞の時計遺伝子 *bmal1* 発現がピーク時に高い濃度を示す。そこで、脂肪細胞の時計遺伝子 *bmal1* 発現ピーク時に行った運動トレーニングの脂肪細胞の脂肪分解反応に及ぼす影響を検討している。脂肪分解反応の亢進は脂肪細胞の小型化に繋がり、肥大した脂肪細胞の縮小ならびに肥大化防止にきわめて有効である。本論文は、*bmal1* mRNA 発現ピーク時、すなわちメラトニン濃度が高い時間帯に行った運動トレーニングが *bmal1* mRNA 発現ボトム時の運動トレーニングに比較し、体重および脂肪組織重量の増加の抑制により効果的であり、この背景には脂肪分解関連分子の酵素活性ならびにタンパク質発現量の増加が関与していることを発見している。そして、時計遺伝子の発現量と脂肪分解反応の律速酵素であるホルモン感受性リパーゼ活性に有意な正の相関があることを 3T3-L1 細胞において確認している。こうした結果は、脂肪細胞の時計遺伝子発現リズムと代謝調節の相互関係を理解する上できわめて貴重な知見である。

脂肪細胞の概日リズムと代謝調節系の相互関係を理解することは、肥満を基盤とした生活習慣病の克服に向けた運動療法のデザイン設計に多大な貢献をもたらす。本研究で得られた成果は、メラトニンが脂肪細胞に及ぼす運動の効果を模倣できる候補物質であることを証明するとともに、脂肪細胞の時計遺伝子発現リズムを考慮した運動実施の最適タイミングを明らかにし、「時間運動療法」を確立するためのエビデンスを提供するもので、高く評価できる。以上のことから、博士 (スポーツ健康科学) の学位論文として十分に価値あるものと認める。

## 総合試験結果の要旨

2016年2月14日

論文題目：Mechanisms of circadian regulation of exercise training-enhanced lipolysis  
in rat adipocytes  
(ラット脂肪細胞における運動トレーニングによる脂肪分解反応増強作用の  
サーカディアン性調節機構)

学位申請者：加藤 久詞

審査委員：

主査： スポーツ健康科学研究科 教授 井澤 鉄也  
副査： スポーツ健康科学研究科 教授 柳田 昌彦  
副査： スポーツ健康科学研究科 教授 北條 達也

要 旨：

本論文提出者は、2013年4月より本学大学院スポーツ健康科学研究科博士課程（後期課程）に在学している。修了に必要な単位取得としては、授業科目において「身体適応科学深論」「トレーニング生理科学深論」の2科目4単位を、そして研究指導科目において「スポーツ健康科学特殊研究Ⅰ～Ⅵ」の6科目12単位を履修しており、必要単位数を満たしている。また各年度において優れた研究成果を挙げ、英語の語学試験にも合格しており十分な能力を有すると認定されている。

博士論文の内容の一部は *Journal of Pineal Research* に筆頭著者として掲載され、他の知見に関しては投稿準備中である。さらに、関連した論文の共著者として、*Biochemical and Biophysical Research Communications*（第2著者）に1報の業績を示している。

2016年1月27日15時30分より約1時間にわたり提出論文に関する学術講演会（博士学位論文公聴会）が開催され、種々質疑討論がなされたが、提出者の説明により十分な理解が得られた。また、審査委員により論文内容ならびにこれらに関連する諸問題について約2時間にわたり口頭試問を実施した結果、本論文提出者は研究者として十分な学力を有することが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

# 博士學位論文要旨

論文題目：

**Mechanisms of circadian regulation of exercise training-enhanced lipolysis in rat adipocytes**

(ラット脂肪細胞における運動トレーニングによる脂肪分解反応増強作用のサーカディアン性調節機構)

氏名： 加藤 久詞

要旨：

## **Chapter 1: Background of research and the objective of doctoral thesis**

Regular physical exercise has the beneficial effect both the maintenance body weight and the improvement of health in humans. One of these beneficial effects was exercise training-enhanced adipocyte lipolysis, which improves adiposity with the decreases in lipid contents and adipocyte size. However, even though there is growing evidence that circadian rhythm mediates adipocyte function including lipolysis, adipogenesis, and secretions of adipokines, the precise mechanisms underlying these effects of exercise training associated with circadian rhythm remains to be unresolved yet. In this doctoral thesis, therefore, the author examined the interaction of circadian rhythm within adipocytes with exercise training-enhanced adipocyte lipolysis in white adipose tissue (WAT). To elucidate the mechanism(s) underlying its interaction will be helpful to understand the roles of WAT in energy supply during exercise and in preventing obesity by reducing fat mass with reduction of triacylglycerol content in adipocytes.

## **Chapter 2: Effect of melatonin on adipogenesis, lipolysis, and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes**

In this chapter, the effect of melatonin on adipocyte lipolysis and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes was examined. Melatonin is synthesized in the pineal gland, and attracts attention to control circadian rhythms both in central and in peripheral tissues, resulting in alterations in metabolic functions of peripheral tissues. Recent advances suggest that melatonin controls adiposity, resulting in changes in body weight. However, the mechanism underlying melatonin-induced reduction in adiposity remains unclear. As a result, the author found that melatonin-treated cells exhibited the cells with the smaller lipid droplets and abundant

expressions of several molecules associated with lipolysis, including ATGL, Perilipin, and CGI-58. Melatonin also significantly increased the expression of PPAR $\gamma$ , a master regulator of adipogenesis, resulting in the promoted differentiation into adipocyte. Moreover, melatonin promoted biogenesis of mitochondria, as indicated by fluorescent staining, elevated the citrate synthase activity, and upregulated the expression of PGC-1 $\alpha$ , a master regulator of mitochondrial master regulator. Furthermore, adiponectin secretion and the expression of adiponectin receptors were also enhanced. These results suggest that melatonin has potential as anti-obesity agent to reverse obesity-related disorders.

### **Chapter 3: Effect of exercise training scheduled in either peak or bottom expressions of *bmal1* mRNA on adipocytes lipolysis**

A recent finding demonstrated that the expression of *hsl* and *atgl* mRNA exhibited circadian variation, and these were directly regulated by CLOCK/BMAL1. On the basis of this finding and the results shown in the chapter 2, the author verified whether exercise training-enhanced adipocyte lipolysis might be changed depending on the relative level of circadian clocks and circulating melatonin. As a result, the author found that exercise training, which was performed at the peak expressions of *bmal1* mRNA and a higher level of plasma melatonin (referred to TR2), was effective to prevent of growth of adiposity, more than exercise training, which was performed at the bottom expression of *bmal1* mRNA and a lower level of plasma melatonin (referred to TR1), doing. This a greater degree of this prevention in TR2 would be due to a greater degree of adipocyte lipolysis with increases in phosphorylated-HSL, compared with those obtained in TR1. Such the differences adipocyte lipolysis and phosphorylating of HSL between TR1 and TR2 might be depend on the differences of *bmal1* mRNA expression. This assumption was confirmed the finding using differentiated 3T3-L1 adipocytes: isoproterenol-induced phosphorylation of HSL depended crucially on the levels of circadian clocks 3T3-L1 adipocytes.

### **Chapter 4: Concluding remarks**

Based upon all of the data obtained in the study, it is concluded that exercise training, which is performed at the peak expression of *bmal1* mRNA and a higher level of circulating melatonin, may be effective to augment the training effect for prevention of growth of adiposity through a greater degree of adipocyte lipolysis, compared to the effect of exercise training, which is performed at the bottom expression of *bmal1* mRNA and a lower level of circulating melatonin.