

温熱負荷が脂肪細胞のエネルギー代謝、中性脂肪蓄積におよぼす影響

西 田 昌 司

The Effects of Heat Shock on Energy and Triglyceride Metabolism of Adipocytes

NISHIDA Masashi

要 旨

肥満は美容上の問題のみならず様々な生活習慣病の原因となる。日常的な温浴が運動と同様に肥満を解消するか否かを、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の温熱刺激モデルを用い、温熱刺激が脂肪細胞の表現型に及ぼす影響から検討した。

脂肪細胞に42℃、1時間の温熱負荷を加えて熱ショック蛋白70（HSP70）の発現を検討すると、負荷30分後から発現の亢進が認められ、細胞が負荷を受けていることが確認できた。ミトコンドリア活性を測定すると、温熱負荷直後より電子伝達系活性の有意な亢進が認められたが、48時間後以降、非負荷群との差は認められなかった。ATP 産生量を測定すると、温熱負荷直後には一旦低下傾向を示した後、負荷 6 時間後からは有意な産生量の増加を示した。脂肪細胞中の中性脂肪量は、単回の42℃、1時間の温熱負荷によっては減少しなかったが、温熱負荷を24時間毎に繰り返すことにより、96時間後には有意に減少した。

以上より、温熱負荷を受けた脂肪細胞は、好氣的な代謝を亢進させて中性脂肪を分解することで肥大化を抑制した。手軽な日常習慣である温浴は、脂肪細胞の肥大化による肥満を改善し、生活習慣病の予防に有効であることが示唆された。

キーワード：温浴、肥満、温熱負荷、脂肪細胞

Abstract

Obesity, caused by the hypertrophy of adipocytes, not only raises cosmetic issues but induces a variety of lifestyle-related diseases. Exercise can reduce body weight, but is difficult to continue daily basis. Hot bathing, relatively easy to take regularly, is also suggested improving obesity. In this study, the direct effect of hyperthermia on adipocytes using a heat shock model of mouse preadipocyte, 3T3-L1.

When heat shock at 42 °C for 1 hour was applied on 3T3-L1, expression of heat shock protein 70, the indicator of cellular stress, was increased 30 minutes after heat shock indicating that the cells were loaded with heat stress. Heat shock at 42 °C for 1 hour also increased mitochondrial electron transport activity, which produces cellular energy from lipid, shortly after heat shock. However, the augmentation of mitochondrial function disappeared after 48 hours. High energy transporter, ATP, once decreased soon after heat shock, began to increase after 6 hours. As the heat shock increased energy production in mitochondria of 3T3-L1, I quantitated the amount of fat accumulation in adipocytes using a triglyceride assay kit. A single application of heat shock at 42 °C for 1 hour did not decrease triglyceride content in 3T3-L1 up to 96 hours after the stress. However, when heat shock was applied every 24 hours, triglyceride decreased significantly after 4 cumulative heat shocks.

These results indicate that heat shock decreases lipid accumulation in adipocytes through the activation of energy metabolism of mitochondria. Therefore, hot bathing can prevent obesity by improving the phenotypes of fat cells.

Keywords: hot bathing, obesity, heat shock, adipocyte

背景

肥満の動向

現在、肥満者の増加が世界的な問題となっている。世界の肥満人口は1975年から急速に増加し、2016年には6億4,100万人（男性 2億6,600万人、女性 3億7,500万人）に達している。肥満の割合は、1975年に比べて男性は3倍以上の11%、女性は2倍以上の15%に上昇しており、有効な対策を採らなければ2025年までに男性の18%、女性の21%が肥満になると予測されている¹⁾。

肥満が増加した原因としては、この半世紀における様々な生活習慣の変化が挙げられている。日本においては、西欧型の食生活の普及や身体活動の低下がエネルギー需給のアンバランスを生み肥満をもたらすと言われてきた。一方、アフリカやインドなどでは、低価格の高エネルギー食品、いわゆる「ジャンクフード」の普及が、人口の多くを占め、従来は低栄養が問題となっていた貧困層でも、肥満が増加する原因となっている¹⁾。

肥満は、ボディーイメージの変化とともに現代では美容上の問題として捉えられ、一部では過度の食事制限（「ダイエット」）によるやせが問題となっている。しかし肥満は健康上の様々な問題をもたらす。1980年代のアメリカでの調査研究では、上半身肥満、糖代謝異常、高中性脂肪血症、高血圧の4つを合併すると心疾患の発症率が急激に高まることが報告され、「死の四重奏」と呼ばれるようになった²⁾。肥満を中心にしたリスクの集積と脳卒中・心疾患との関係は各国で報告され、日本における「メタボリックシンドローム」も同様の概念である³⁾。

肥満と脂肪細胞

このような肥満は、脂肪細胞への中性脂肪の蓄積によって生じる。摂取した食品は代謝され、様々な活動のエネルギー源となる。しかし、生活習慣の変化などによって、食品から作られたエネルギー量が身体活動で使われるエネルギー量を凌駕すると、余剰のエネルギーは貯蔵体の中性脂肪に変換され、脂肪細胞に蓄積される。脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞が有るが、褐色脂肪細胞は脂肪を燃焼して熱を作る特別な細胞で、脂肪の蓄積は白色脂肪細胞に起こる⁴⁾。

白色脂肪細胞には、皮膚の直下に存在する皮下脂肪と腹腔内の腸間膜周囲に存在する内臓脂肪の二種類が存在する。どちらも余剰エネルギーを蓄積するが、皮下脂肪は蓄熱やクッションとしての役割を持ち、長期的に中性脂肪を蓄積する。一方、内臓脂肪は一時的にエネルギーを貯蔵し、必要ときに迅速に臓器に届ける役割を果たす。従って肥満との関連では、皮下脂肪への中性脂肪の蓄積は美容上の問題をもたらす、内臓脂肪への蓄積は健康上のリスクと関係する。

白色脂肪細胞に中性脂肪が蓄積すると、単に体積が増加して細胞の肥大化をもたらすのみではなく、脂肪細胞の形質転換を起こす。近年、白色脂肪細胞はアディポサイトカインと呼ばれ

るホルモン様物質を分泌し、活発な内分泌機能を営むことが明らかとなってきた⁴⁾。通常の脂肪細胞はアディポネクチンを分泌し抗動脈硬化作用を発揮するが、肥大化すると、血栓形成を亢進する PAI-1、インスリン効果を低下させる TNF- α 、血圧を上昇させるアンジオテンシノーゲンを分泌するようになる。内臓脂肪では、これらのいわゆる「悪玉」アディポサイトカインが血管や臓器を傷害し、動脈硬化を進展させるとともに脳卒中や心疾患の発症率を増加させる⁵⁾。一方、皮下脂肪は、中性脂肪の蓄積が進むと細胞自体が傷害されて炎症を起こし、慢性化すると脂肪組織の線維化からセルライトと呼ばれる硬化した組織となり、美容上の問題を生じる⁶⁾。

温熱負荷と健康

このような肥満に伴う美容や健康上の問題を解決するには、脂肪細胞への中性脂肪蓄積の原因となる食事による過剰なエネルギー摂取と、運動不足によるエネルギー消費の低下を改善する必要がある。実際、肥満改善のための様々な食事療法や運動療法のプロトコルが開発されているが、薬剤の内服とは異なり日々の生活習慣の改善を継続することは、困難を伴うことが多い。

一方、入浴も、特に日本人にとっては日常的で、日々継続することが比較的容易な生活習慣で、温泉療法のように、健康に対しても良い効果を与えることが知られていた。従来は、温泉成分の皮膚に対する効果や、温浴によるリラックス効果、血流改善効果によって健康増進が図られると考えてきた。しかし、水による加圧や浮力が加わらない乾式サウナを用いた検討でも、心不全や動脈硬化、さらに慢性疲労症候群を改善することが報告されており、熱負荷自体が身体の代謝を変化させ、健康効果を発揮する可能性が示されている⁷⁾。

温熱負荷は、肥満に関しても改善効果を発揮する可能性がある。温浴とサイクリングを比較した検討では、1時間、40℃の温浴は30分のサイクリングと同程度のカロリーを消費するとともに、食後血糖値のピークはサイクリング群よりも10%低下していた⁸⁾。温浴が運動と同様にエネルギー代謝を亢進させていることから、脂肪細胞に蓄積された脂肪滴を分解してエネルギーを産生し、脂肪細胞の肥大を予防・改善させる可能性が考えられる。

目 的

本研究では、温浴が肥満を改善するか否かを、培養脂肪細胞の温熱負荷モデルを用いて検討する。そのため、肥大化に関わる脂肪細胞の特性として、脂肪代謝の場であるミトコンドリアの活性、代謝の結果として産生されるエネルギーである ATP 量、さらに肥大化の原因である中性脂肪の蓄積量の3つを指標として、検討する。

脂肪細胞への温熱負荷

脂肪細胞として、マウス由来の前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を用いた。3T3-L1 は、5%牛胎児血清を含む増殖培地中では線維芽細胞様の形態で細胞分裂を繰り返すが、血清を除去してインスリン、デキサメタゾンを含む分化培地に変更すると分裂を中止し、脂肪滴を蓄積した脂肪細

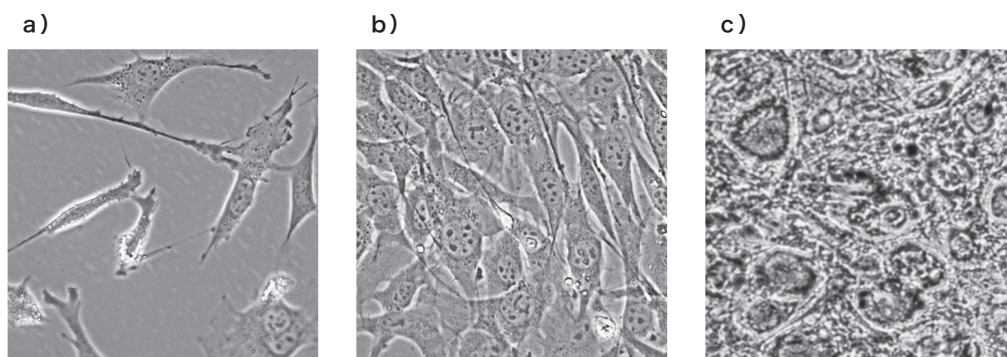


図1 前駆脂肪細胞 3T3-L1 の培養

a) 播種直後、b) 増殖培地での培養、c) 分化培地での培養（脂肪染色後。黒点は脂肪滴）

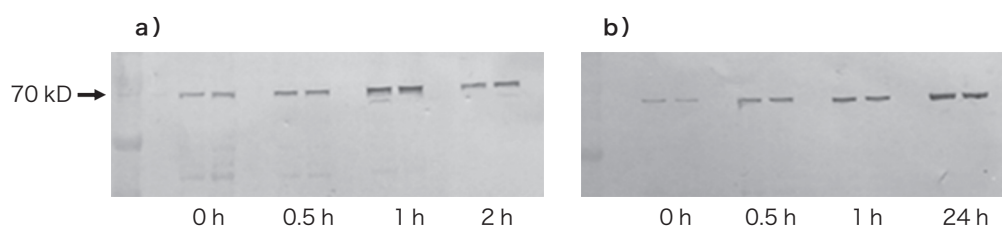


図2 温熱負荷による 3T3-L1 の HSP70 発現

a) 42℃の温熱負荷を0～2時間加え、37℃で1時間培養した後にタンパク質を回収
b) 42℃の温熱負荷を1時間加え、37℃で0～24時間培養した後にタンパク質を回収

胞に形質転換する（図1）。

脂肪細胞への温熱刺激は、細胞培養の温度を上昇させることにより負荷した。通常の5%CO₂、37℃で3T3-L1を増殖・分化させた後、培養器の温度を42℃に上昇させて温熱刺激を加えた。細胞に温熱負荷が加わったか否かは、ストレスタンパク質の熱ショック蛋白70（HSP70）発現によって確認した。HSP70は熱刺激によって細胞内に生じた変性蛋白の処理のために誘導されるシャペロン蛋白で、様々な細胞において熱負荷の指標として用いられる。

温熱刺激後に細胞内のタンパク質を回収し、HSP70に対する特異的な抗体（Santa Cruz Biotechnology、sc-32239）を用いたウエスタンブロット法でタンパク質発現を検討すると、30分の温熱負荷によってHSP70発現が増加し、1時間でピークを迎え、2時間負荷を加えると減少傾向を示した（図2a）。そこで最も強くHSP70を誘導した1時間の温熱負荷を加えた後、タンパク質回収までの時間を変化させると、負荷後30分でHSP70発現が開始し、24時間後まで増加を続けた（図2b）。

温熱負荷がミトコンドリア活性に及ぼす影響

培養脂肪細胞を用いて温熱負荷モデルを作成できることが確認されたため、温熱負荷が脂肪細胞の肥大化に及ぼす影響を検討した。脂肪細胞の中性脂肪代謝の指標として、最も効率よく脂肪を原料としてエネルギーを産生するミトコンドリアの活性を検討した。好氣的代謝を行う

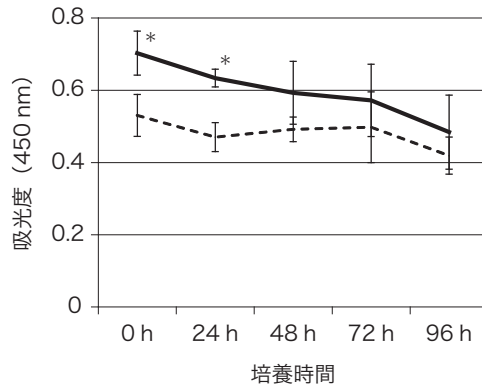


図3 温熱負荷が3T3-L1のミトコンドリア活性に及ぼす影響

3T3-L1に42℃、1時間の温熱負荷を加え、直後から96時間後まで24時間ごとにWST-1試薬を添加してミトコンドリア活性を定量
 実線：温熱負荷（+） 破線：温熱負荷（-） * $p < 0.05$ vs 温熱負荷（-）

ミトコンドリアは、中性脂肪を分解して得られるアセチル CoA を、クエン酸回路と電子伝達系を用いて酸素の還元と共役させ、大量の ATP を産生してエネルギーに変換する。まず、温熱負荷がミトコンドリアに及ぼす影響を、電子伝達系活性から検討した。

WST-1 試薬（タカラバイオ、MK400）が活性化された電子伝達系のコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素によって褐色のホルマザン色素に変換されることを利用して、3T3-L1に42℃、1時間の温熱負荷を加えた後、経時的にWST-1試薬を添加し、産生されたホルマザン色素を450 nmの吸光度で測定することによってミトコンドリア活性を定量した。温熱負荷を加えない群と比べ、温熱負荷群は負荷直後よりミトコンドリア活性が亢進した。温熱負荷によるミトコンドリアの活性化は負荷後96時間まで持続したが、非負荷群との差は時間とともに減少傾向を示した（図3）。

温熱負荷が ATP 産生量に及ぼす影響

次に、温熱負荷によって活性化されたミトコンドリアが実際に脂肪を分解して多くのエネルギーを産生しているかを、3T3-L1のATP産生量を測定することにより検討した。ATP産生量は、ATPアッセイキット（Dojindo、A550）を用いて測定した。ホタルルシフェリンは、ルシフェラーゼとマグネシウムイオンの存在下にATPのエネルギーを用いてオキシルルシフェリンに変換される。このとき発生する発光を、ルミノメーターを用いて定量することでATP産生量を評価する。

同様に3T3-L1に42℃、1時間の温熱負荷を加えた後に、経時的に24時間までATP抽出液を添加した。抽出したATPにホタルルシフェリンを含むATP検出試薬を添加してATP産生量を定量すると、温熱負荷直後に比べて30分後にはATPは約1/2に減少した。しかしその後ATP量は増加し、6時間から24時間に掛けて約2倍に増加した（図4）。

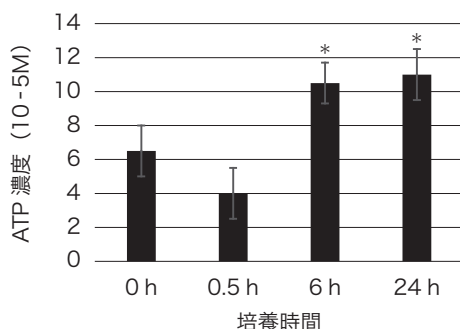


図4 温熱負荷が 3T3-L1 の ATP 産生に及ぼす影響

3T3-L1 に42℃、1時間の温熱負荷を加え、直後から24時間後まで細胞内 ATP を回収して定量

*p < 0.05 vs 0 h

温熱負荷が中性脂肪蓄積量に及ぼす影響

このような温熱負荷によるミトコンドリア活性化によるエネルギー産生の亢進が脂肪細胞の肥大化を抑制するかを、細胞内の中性脂肪を定量することにより検討した。中性脂肪の定量には、トリグリセリド定量キット (Cell Bio Labs、STA-396) を用いた。細胞に界面活性剤 Triton-X を添加して中性脂肪を回収し、超音波処理にて均一に分散したのち、リパーゼを添加して加水分解する。得られたグリセロールをリン酸化し、さらに酸化することにより生じた過酸化水素を、発色プローブと反応させ 570 nm の吸光度を測定することにより、中性脂肪量を定量する。

3T3-L1 に42℃、1時間の温熱負荷を加えた後、24時間毎に96時間まで測定すると、細胞内の中性脂肪は温熱負荷直後と変化を示さなかった (結果は提示せず)。そこで42℃、1時間の温熱負荷を 0 から96時間まで24時間毎に加え、その直後に脂肪細胞から中性脂肪を回収して定

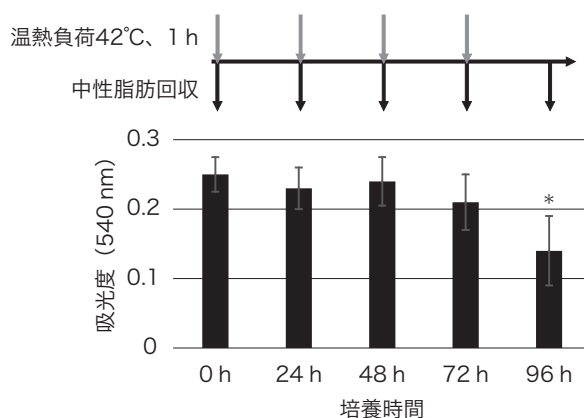


図5 温熱負荷が 3T3-L1 の中性脂肪蓄積に及ぼす影響

3T3-L1 に42℃、1時間の温熱負荷を加えた直後に中性脂肪を回収して中性脂肪量を定量する処理を、24時間毎に0時間から96時間後まで反復

*p < 0.05 vs 0 h

量を行った。細胞内中性脂肪は48時間までは変化を示さなかったが、72時間から減少傾向を示し、96時間では40%以上の有意な減少を示した(図5)。

考 察

本研究では、温浴が肥満を改善するか否かを、培養脂肪細胞の温熱負荷モデルを用いて検討した。脂肪細胞に分化する3T3-L1を42℃で培養すると、細胞内にストレスタンパク質のHSP70が誘導されたことから、細胞に温熱負荷が加わっていることが確認できた。温熱負荷は、負荷直後より脂肪細胞のミトコンドリア活性を亢進し、6時間後に細胞内のATP産生量を増加させた。さらに温熱刺激を継続して負荷することにより、96時間後には細胞内の中性脂肪量を減少させた。

実験に用いた42℃の温熱負荷は、原核細胞から動物細胞に至る様々な培養細胞や実験動物への温熱刺激として用いられている⁹⁾。今回の結果では負荷30分後からHSP発現が増加し、1時間でピークを迎え、2時間後には減少傾向を示した。従って、この条件で十分に細胞レベルのストレス応答が惹起されるが、長時間に及ぶ温熱負荷はストレス応答の破綻を招く可能性が示唆される。

温熱負荷が細胞のストレス応答を惹起するメカニズムとしては、小胞体ストレスの亢進が挙げられる¹⁰⁾。細胞内のタンパク質は温熱負荷によって熱変性を起こす。変性したタンパク質は小胞体に取り込まれるが、小胞体膜には変性タンパク質と結合する複数の受容体が存在する。受容体が活性化されるとHSPを誘導して異常タンパク質を修復したり、細胞内の代謝を亢進したりする。このような異常タンパク質の集積による小胞体ストレスに対する応答は異常蛋白応答(unfolded protein response: UPR)¹¹⁾と呼ばれ、動物を含む広い範囲の生物の細胞で保存されたストレス応答機構である。

今回の実験系では、42℃、1時間の温熱負荷によって、まず1時間をピークにHSPの発現が増加したが、それよりも早く、負荷直後より、ミトコンドリアの電子伝達系活性が亢進した。エネルギー産生は転写翻訳を伴うHSPの合成などのストレス応答の実行に必要であるため、最も早く活性化されたと考えられる。実際に合成されるATP量は温熱負荷の直後には減少傾向を示し、様々な急性期のUPRにエネルギーが利用されていることが窺える。温熱負荷の24時間後には細胞内のHSP発現、ATP量ともに増加し、ミトコンドリア活性も温熱負荷を加えない群と比べて高値を示すものの減少傾向に有ることから、この時点で急性期のストレス応答は完成しているものと考えられる。

一方、脂肪細胞中の中性脂肪は、一回の42℃、1時間の温熱負荷では負荷後96時間まで追跡しても減少を示さず、24時間間隔で温熱負荷を繰り返すことにより、96時間後に有意に減少した。温熱負荷が中性脂肪を減少させるメカニズムとしては、エネルギー産生の原料として中性脂肪を分解する可能性があり、有意な中性脂肪の減少には複数回の温熱負荷の蓄積が必要と考えられる。また、脂肪細胞の温熱負荷に対する慢性のストレス応答として、エネルギー産生機構が細胞質での嫌氣的な解糖系からミトコンドリアでの好氣的な電子伝達系に変化した可能性も考えられる。本来、脂肪細胞は脂肪蓄積を機能とするため、脂肪を利用する好氣的代謝は抑

制されている¹²⁾。しかし、繰り返す温熱負荷に対する慢性的なストレス応答として、ミトコンドリアでの好氣的代謝が亢進し、中性脂肪の分解が起こった可能性も示唆される。

以上、温熱負荷が脂肪細胞の脂肪燃焼を惹起することが示されたが、日本人にとって馴染み深く、比較的容易に継続することができる温浴が肥満の解消に有用であるかは、ヒトレベルでの入浴温度や時間、間隔、効果の持続など、温浴のプロトコールを、更に検討する必要がある。

本研究の一部は、2020年度神戸女学院大学研究所研究助成、神戸女学院大学人間科学部教育研究助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) NCD Risk Factor Collaboration: Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1377-1396.
- 2) Kaplan NM: The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 1989; 149: 1514-1520.
- 3) Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et. al: Diagnosis and management of the metabolic syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2735-2752.
- 4) Nakagami H: The mechanism of white and brown adipocyte differentiation. *Diabetes Metab J* 2013; 37: 85-90.
- 5) Tilg H, Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 772-783.
- 6) Tokarska K, Tokarski S, Woźniacka A, et. al: Cellulite: a cosmetic or systemic issue? Contemporary views on the etiopathogenesis of cellulite. *Adv Dermatol Allergol* 2018; 35: 442-446.
- 7) 鄭忠和 : 温熱療法とは : *Medical Practice* 2001; 18: 1150-1151.
- 8) Faulkner SH, Jackson S, Fatania G, et. al: The effect of passive heating on heat shock protein 70 and interleukin-6: A possible treatment tool for metabolic diseases? *Temperature* 2017; 4: 292-304.
- 9) Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, et. al: Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1805-1813.
- 10) Kadowaki H, Nishitoh H: Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes* 2013; 4: 306-333.
- 11) Hetz C: The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012; 13: 89-102.
- 12) Guoa X, Lia H, Xua H, et. al: Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012; 2: 358-367.

(原稿受理日 2021年3月1日)