

機械的刺激とカフェイン摂取による脂肪分解促進効果

山田 茂・田中涼子・大橋 文・岩田華苗

食生活科学科 スポーツ栄養学研究室

Effect of mechanical stimulation and caffeine on lipolysis in vitro

Shigeru YAMADA, Ryouko TANAKA, Aya OHASHI and Kanae IWATA

Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

In this experiment, we investigated the effects of mechanical stimulation and caffeine on lipolysis in the adipocyte culture cell. Caffeine (0 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml) which promotes lipolysis, was added to the culture medium (10%FBS, DMEM) respectively. Adipocytes underwent repeated mechanical irritation by Flexer cell strain unit to observe the effect on the lipolysis of mechanical stimulation. We measured glycerol in a culture medium to confirm the lipolysis. Adipocyte were stained for lipolysis responses by Oil Red O. The effect of caffeine on lipolysis was slightly observed, but a significant effect statistically was not observed. On the other hand, mechanical stimulation increased lipolysis in the adipocyte culture cells. Influences of a combination of mechanical stimulation and caffeine on lipolysis were examined. The results of these experiments, the effect of mechanical stimulation on the lipolysis was outstanding, but was scarcely effected by caffeine. That is, direct mechanical stimulation was effective in increasing the burning of fat. Further research is required on the mechanisms of mechanical stimulation to promote lipolysis in adipose cells.

Key words : Adipocyte (脂肪細胞), Lipolysis (脂肪分解), Caffeine (カフェイン), Mechanical stimulation (機械的刺激)

1. はじめに

昔から、カフェイン摂取によりエネルギー消費が亢進することが知られている。Braccoら¹⁾はカフェイン摂取が痩せた女性に比較して、太った人で脂肪酸化を促進することを示した。Astrup²⁾らも食事を制限した太った女性にカフェインとエフェドリンの混合物を摂取させた結果、脂肪酸の酸化が亢進したことを報告した。しかしながら、カフェインは痩せた被験者に対してのみ脂肪分解や脂肪酸化を亢進させるが、肥満者に対しては効果がないという報告も見られる。このように、一般的に、カフェインが脂肪分解を促し脂肪酸酸化を亢進させるものと考えられているが、その効果については不明な部分が多い。カフェインを摂取した後のエネルギー消費や血液中の物質の変化は交感神経活動が亢進した時の変化に似ている。Belletら³⁾はコーヒーやカフェインを摂取した後に血液中の遊離脂

肪酸の濃度が高まり、尿中にはカテコールアミンの排泄が増加することを報告した。すなわち、カフェインがカテコールアミンの増加を招き、脂肪分解が亢進したものと推測している。しかしながら同様な研究で、カフェインが脂肪分解を促した理由として環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性を阻害したことに依るとする報告がある。即ち、サイクリック AMP 濃度が高い状態に保つことにより、リパーゼ活性を高め、脂肪分解を促進するというものである⁴⁾。運動においても脂肪分解や脂肪酸酸化は亢進する。多くの研究者が指摘するように骨格筋での脂肪酸の酸化は運動強度よりも運動時間に強く依存している。トレーニングは骨格筋細胞で脂肪酸の取り込みを増大させる。さらに、骨格筋内でのホルモン感受性リパーゼの活性が亢進することが判明している。この運動時のホルモン感受性リパーゼの活性を刺激する機構として運動時の

血中カテコールアミンの増加が報告されている。カテコールアミンの増加に伴って β -アドレナリン受容体-アデニル酸シクラーゼ系が活性化される。それに続いて、cAMP-dependent protein kinase を介してホルモン感受性リパーゼが活性化するものと考えられている。これは上記のカフェインと同様の機構であることが示唆される。しかしながら、脂肪の分解は摘出筋に対する電気刺激でも見られることから β -アドレナリン受容体-アデニル酸シクラーゼ系以外の機構が示唆される⁵⁾。

そこで、著者らは、カフェインの脂肪分解機構を解明するため手始めとして培養細胞を用い、脂肪細胞に機械的的刺激とカフェインを添加した時の脂肪分解について検討した。

2. 実験方法

2-1. 試薬と機材

①器具・機材

FLEXER CELL STRAIN UNIT FLEXCELL Ltd.

- ・ ODYSSEY 株式会社エムエス テクノシステム
- ・ MICRO PLEAT READER BIORED Ltd.

②細胞

細胞は3T3-L1細胞(マウス脂肪前駆細胞)を使用した。この細胞はマウス胎児由来の3T3繊維芽細胞株より分離されたもので、脂肪細胞へと分化する能力を持っている^{6,7)}。

③培地

- ・ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 : GIBCO
- ・ Penicillin (抗生物質) : GIBCO
- ・ FBS (牛胎児血清) : GIBCO

④添加試薬

- ・ Caffeine (純度 98.5%) : キシダ化学株式会社

⑤測定キット

1) Adipogenesis Assay kit: Cayman Chemical Company

3T3-L1細胞(脂肪前駆細胞)の分化を誘導するための試薬が含まれている。脂肪生成の誘導や阻害の研究に用いることができる。また、脂肪滴をOil Red O溶液で染色し、脂肪生成の度合いを確認できる。

⑥分化誘導剤

10% FBSを含むDMEM培地10mlにキットに含まれている下記の試薬をそれぞれ添加する。

—脂肪分化誘導培地—

- ・ IBMX Solution (1000X) 10 μ l
- ・ Insulin Solution (1000X) 10 μ l
- ・ Dexamethasone Solution 10 μ l

—インスリン培地—

- ・ Insulin Solution (1000X) 10 μ l

⑦染色キット

- ・ Lipid Droplets Assay Fixative (10X)
- ・ Fixative (10X) 5mlに、PBSを45ml加えて調整する。
- ・ Lipid Droplets Assay Wash Solution
- ・ Lipid Droplets Assay Oil Red O Solution

→Oil Red O Solution: 純水=4:6になるように調整する。

⑧ Adipolysis Assay Kit: Cayman Chemical Company

3T3-L1細胞を使用して脂肪分解(Adipolysis)を比色法で簡便に解析できるキット。

⑨グリセロール定量

- ・ Glycerol Standard Solution

①から⑥のチューブを用意し、そのうち②~⑥には100 μ lの培地を加える。①のチューブに200 μ lのGlycerol Standard Solutionを加え、チューブ①から100 μ l取り除き、チューブ②に移して希釈し、よく混ぜる。チューブ②から100 μ lを取りチューブ③に移して希釈する。それを⑤まで繰り返す。⑥には何も加えず、コントロールとする。

- ・ Free Glycerol Assay Reagent (10X)

キットに含まれているFree Glycerol Assay Reagent 1本に対して純水を5ml加え、溶かす。

2-2. 細胞の培養実験

培地は10% FBSを含むDMEMを用い、抗生物質(ペニシリン)はDMEM培地に対して0.5%になるように調整した。培養は、全て37 $^{\circ}$ C・CO₂5%下で行う。

1) 培養・脂肪細胞への分化誘導

液体窒素から凍結アンプルを取り出し、37 $^{\circ}$ Cの湯浴で、攪拌する。

- 約半分程度融解したことを確認したら、湯浴から取り出し、アンプルを攪拌させながら、余熱ですべて融解する。
- 15mlの遠沈管に細胞浮遊液を全量移し、10% FBSを含むDMEM培地を5ml加え、数回ピ

ペッティングしたのち 1000rpm で 2 分間遠心する。

- c) 上清を取り除き、培地を 2ml 添加し、細胞数を計測する。
- d) 培地を用い、細胞濃度を 3×10^4 cell/ ウェルに調製し、12 ウェルプレートに播種し、インキュベーター内 (37°C、5% CO₂) でコンフルエントに達するまで培養した。1 日おきに培地交換する。
- e) コンフルエントに達したことを確認後、分化誘導を開始するまでさらに 2 日間培養を行なう。
- f) 培地を除き、脂肪分化誘導培地に交換し、3 日間培養し、脂肪細胞へと分化誘導する。
- g) その後、脂肪分化誘導培地を除き、インスリン培地に交換し、4 日間培養を行い、脂肪滴を蓄積する。この間培地は 1 日おきに交換する。

2) カフェイン添加

培養した細胞にカフェインを 0μg/ml、50μg/ml、100μg/ml 培地中に添加⁸⁾して、24 時間培養を行い、培地を除去し Oil Red O 溶液で、細胞の染色する。さらに、Adipolysis Assay kit にて培地中のグリセロール量を測定する。

3) 機械的伸展刺激

運動の効果を調べるため、培養した脂肪細胞に FLEXER CELL STRAIN UNIT (図 1) を用いて、伸展刺激を与えながら培養を行った。そのうちカフェイン非添加群、添加群 (100μg/ml) に分けた。実験 1 と同様に染色、グリセロール量の測定を行った。

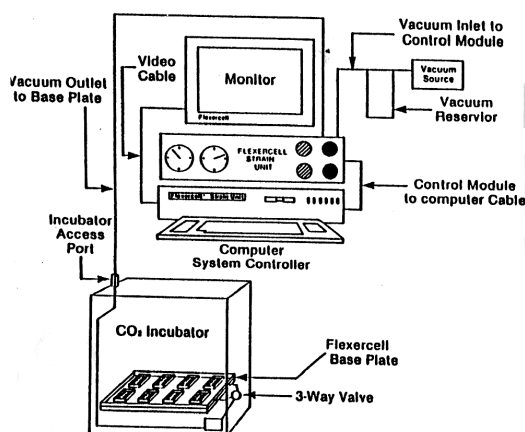


図 1 Flexer Cell Strain Unit

4) 脂肪細胞の Oil Red O 染色

- a) ウェル中の培地を取り除く。
- b) すべてのウェルに Lipid Droplets Assay Fixative 600μl 加え、室温で 15 分間インキュベートする。
- c) Wash Solution にて、ウェルを 2 回洗う。
- d) プレートを完全に乾かす。
- e) Oil Red O working Solution 600μl を全てのウェルに加え、15 分間インキュベートする。
- f) Oil Red O working Solution を除き、細胞を蒸留水でピンク色が消えるまで洗う。
- g) Wash Solution でウェルを素早く 2 回洗った後、完全に乾かす。
- h) Odyssey700nm の波長で脂肪滴染色の吸光度を測定する。

5) グリセロールの定量

- a) 培養が終了後、培地を取り除く。
- b) 新しい 96well プレートを用意し、1 つの検体に対して 3 つのウェルを使う。
- c) 検量線を作成するために、チューブ①から⑥のように 25μl ずつウェルに加える。
- d) 1) で得られたサンプルを 25μl ずつウェルに加える。
- e) 調整した Free Glycerol Assay Reagent 試薬を 100μl ずつ、全てのウェルに加える。
- f) 室温で 20 分インキュベートする。
- g) ただちに、マイクロプレートリーダーにて 540nm の波長で吸光度を測定する。

検量線は、キット内容から調整した Glycerol Standard Solution の吸光度からコントロールである培地の吸光度を引き、Microsoft Office Excel 2010 で作成した。グリセロール濃度は、サンプルの吸光度から培地 (コントロール) の吸光度を差し引き、検量線の式に代入することで求める。

2-3. 統計的処理

統計的処理は、一元配置分散分析を用いて有意差を確認し、多重比較 (Tukey) で各群の有意性について検討した。P<0.05 を有意とする。

3. 結果

実験1 脂肪細胞に対するカフェイン添加の影響

カフェイン濃度、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各群の脂肪細胞を染色し Odyssey 用いて吸光度を測定し、それぞれの群の平均値を比較した。吸光度は(図2)、カフェイン添加量0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群は274 \pm 31.7、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群は、230.2 \pm 39.6、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群は224.0 \pm 10.0であった。各群の平均値間に統計的な有意差はみられなかった。細胞培養中に脂肪細胞から放出されたグリセロール量(図3)は、カフェイン添加量0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群で61.79 \pm 10.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群で89.18 \pm 12.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群で87.51 \pm 11.095 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。カフェイン添加群のグリセロール量は増加傾向を示したが統計的に有意な差は見られなかった。

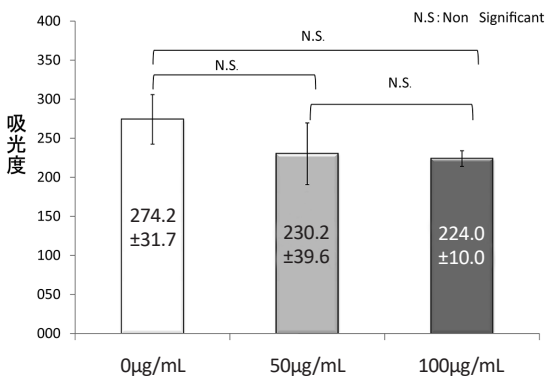


図2 カフェイン添加の脂肪吸光度

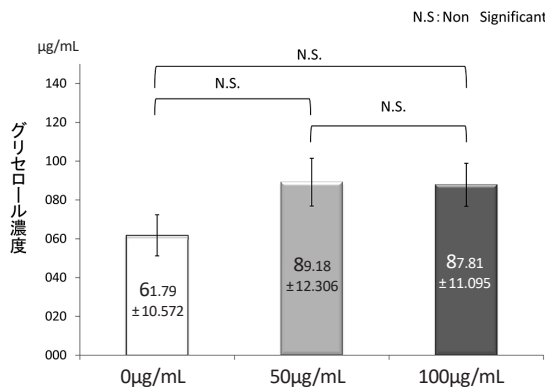


図3 カフェイン添加におけるグリセロール量

実験2 脂肪細胞に対する機械的伸展刺激の効果とカフェイン添加併用の効果

機械的伸展刺激群で、カフェイン添加量0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群と100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各群の脂肪細胞を染色して Odyssey で吸光度を測定した。各群の平均値を比較すると、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群は41.6 \pm 18.4、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群は56.4 \pm 21.2であった。各群の平均値間に統計的な有意差はみられなかった。

各群の培養液上清中のグリセロール量の平均値は、カフェイン添加0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群で136.13 \pm 10.571 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群で126.91 \pm 8.208 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。各群の平均値間に統計的に有意な差は見られなかった。

非機械的伸展刺激群と機械的伸展刺激群の脂肪細胞の染色後の吸光度の平均値を比較した。吸光度は非機械的伸展刺激群で274.2 \pm 31.71、機械的伸展刺激群で41.6 \pm 18.46であり、各群の平均値間に統計的に有意な差が見られた。さらに、培養上清中に放出されたグリセロール量の平均値(図4)を比較すると、グリセロール量は、非機械的伸展刺激群で61.79 \pm

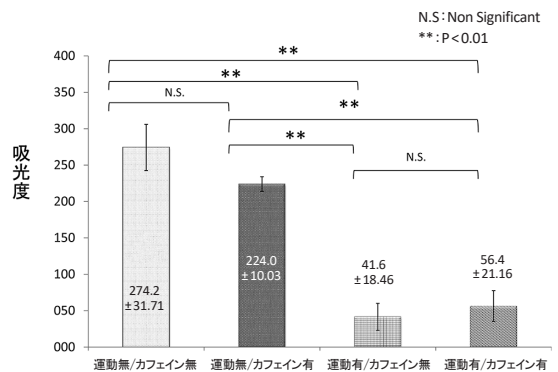


図4 運動群、非運動群の脂肪の吸光度

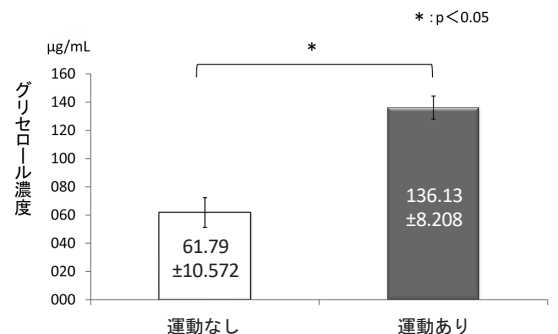


図5 運動群、非運動群のグリセロール濃度

10.572 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 、機械的伸展刺激群で 136.13 \pm 8.208 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ であった。各群の平均値間に統計的有意な差がみられた。(図5)

よって、カフェイン添加と機械的伸展刺激での併用効果はなく、脂肪細胞にはカフェイン添加よりも機械的伸展刺激の影響が大きいということが確認された。

4. 考察

一般的にカフェインの作用として①アデノシン受容体の遮断②ホスホジエステラーゼの阻害③ドーパミンD2受容体刺激などがあげられる。今回の実験で、脂肪細胞での脂肪分解を促す系として、ホスホジエステラーゼの阻害考えられる。細胞内のホスホジエステラーゼの活性がカフェインによって阻害され、その結果、cAMPやcGMPの減少を防ぎ、ATPやGTPの産生を減少させるものである。この効果により細胞内カルシウム濃度が上昇するものと考えられている。細胞内カルシウム濃度の上昇により、カルモジュリンが活性化し、脂肪分解を促進するものと考えられている。Hashimotoら⁶⁾は、*in vitro*の実験で、カフェイン添加により脂肪分解の代謝産物であるグリセロールと脂肪が培地で増加すると報告している。その際、ホルモン感受性リパーゼ、CGI-58やATGLの増加があることを観察している。今回の実験で脂肪細胞にカフェイン添加により脂肪滴は減少傾向を示し、グリセロール量は増加傾向にあった。このことから、脂肪細胞での脂肪分解に対するカフェインの効果が示唆された。Murosakiら⁷⁾は*in vitro*で、カフェイン添加により脂肪分解と脂肪酸酸化の増加が亢進することを報告している。今回の実験ではカフェイン添加による脂肪分解は統計的に明確ではなかったが、カフェインの添加量や添加時間などを考慮して、今後検討する必要がある。

*in vitro*の実験で、機械的伸展刺激を直接、脂肪細胞に与えたところ脂肪分解が有意に促進され、脂肪分解に効果があることが確認された。これまで脂肪細胞での脂肪分解機構について、アドレナリンやノルアドレナリンなどのカテコールアミンが β 受容体に結合するとGタンパク質シグナル伝達系に作用し細胞内cAMPの濃度が上昇しタンパク質キナーゼAが活性化される。次いで、タンパク質キナーゼAは、脂肪滴表面の存在するペリリピンと細胞質に存在するホル

モン感受性リパーゼをリン酸化して脂肪滴表面に移行し、トリグリセリドの加水分解を開始すると考えられている。しかしながら今回の*in vitro*の実験ではカテコールアミンなどの挙動は考えられず、機械的伸展刺激による引き起こされる何らかの刺激が脂肪細胞での脂肪分解を促進したものと考えられる。さらにカフェイン添加と機械的刺激の脂肪分解に相乗効果は観察されなかった。カフェインの作用機序と機械的刺激による機序は明らかに異なることが示唆された。今後、機械的刺激による脂肪分解の機序について更なる検討する必要がある。

参考文献

- 1) Bracco D, Ferrara J-M, Arnaud MJ, Jéquier E, Schutz Y. Effects of caffeine on energy metabolism, heart rate and methylxanthine metabolism in lean and obese women. *Am J Physiol* 1995; 269: E671-8.
- 2) Astrup A, Buemann B, Christensen NJ, et al. The effect of ephedrine/caffeine mixtures on energy expenditure and body composition in obese women. *Metabolism* 1992; 41: 686-8.
- 3) Bellet S, Kershbaum A, Finck EM. Response of free fatty acids to coffee and caffeine. *Metabolism* 1968; 17: 702-7.
- 4) Butcher RW, Baird CE, Sutherland EW. Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3,5-monophosphate levels in isolated fat cells. *J Biol Chem* 1968; 243: 1705-12.
- 5) 駒林隆夫 トレーニングと骨格筋での脂質の代謝変化
山田 茂、福永哲夫編集 生化学、生理学からみた骨格筋に対するトレーニング効果 144-157 ナップ 1966
- 6) Hashimoto T1, Sato K, Iemitsu M. Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Jul 15;115(2):260-7.
- 7) Murosaki S1, Lee TR, Muroyama K, Shin ES, Cho SY, Yamamoto Y, Lee SJ. A combination of caffeine, arginine, soy isoflavones, and L-carnitine enhances both lipolysis and fatty acid oxidation in 3T3-L1 and HepG2 cells *in vitro* and in KK mice *in vivo*. *J Nutr*. 2007 Oct;137(10):2252-7.