

duction at 24 h (Fig. 2A). The induction was dose dependent (Fig. 2B) and blocked by addition of RU38486 (RU486) (Fig. 2C), a glucocorticoid receptor (GR) antagonist, demonstrating its dependence upon activation of GR. The time course of 11 β -HSD1 mRNA induction, with little or no effect of dexamethasone within 2 h, suggested that 11 β -HSD1 is not a primary glucocorticoid response gene. Consistent with this, the induction of 11 β -HSD1 mRNA was blocked by the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Fig. 2D) and thus requires new protein synthesis.

Glucocorticoid Regulation of the 11 β -HSD1 P2 Promoter Requires C/EBP-Binding Sites FP3 and FP4

The P2 promoter, but not the P1 promoter, of 11 β -HSD1 is active in transiently transfected A549 cells (27) (and data not shown). Dexamethasone increased activity of a P2 promoter-reporter construct in transfected A549 cells, with a similar dose response to the endogenous gene (Fig. 3A). A deletion series of the 11 β -HSD1 P2 promoter was used to localize the glucocorticoid-responsive region. Although 5' deletion of the promoter to -196 had no effect on glucocorticoid induction, deletion from -196 to -124 abolished the response to glucocorticoid (Fig. 3B). Furthermore, internal deletions that removed this region (deletion of -1299 to -125 or deletion of -311 to -125) also abolished the dexamethasone response (Fig. 3B), demonstrating that the region between -196 and -124 is essential for glucocorticoid induction of the 11 β -HSD1 P2 promoter and that sequences upstream of -311 do not contribute to the induction.

The region between -196 and +49 remained fully responsive to dexamethasone. We have shown previ-

ously that this region contains four binding sites, footprints (FP) 1–4, for members of the C/EBP family of transcription factors (26). These sites synergize, so that their combined mutation markedly attenuated or abolished C/EBP α regulation of the promoter in HepG2 hepatoma cells, but mutation individually reduced only the C/EBP α effect (26). In transiently transfected A549 cells, mutation of either FP3 or FP4 alone modestly reduced or had little effect upon dexamethasone induction of the promoter (Fig. 3C). However, mutation of both sites prevented the glucocorticoid induction (Fig. 3C), suggesting that these C/EBP-binding sites mediate the glucocorticoid response. In support of this, transfer of one, two, or three copies of the fragment encoding -196 to -88, which includes FP3 and FP4, to a heterologous promoter conferred an incremental increase in both basal promoter activity and glucocorticoid response, dependent upon copy number (Fig. 3D), confirming the presence of a glucocorticoid-responsive region between -196 and -88. Between FP3 and FP4 is a sequence that partly matches a GR consensus binding site or glucocorticoid response element (GRE) (identical at nine of 12 conserved nucleotides). However, mutation of this putative GRE did not affect the glucocorticoid response (Fig. 3E). Furthermore, the dexamethasone effect on promoters with combined mutation of the putative GRE and either FP3 or FP4 was indistinguishable from the effect on promoters with mutant FP3 or FP4 sites alone (Fig. 3E).

C/EBP β Binds to the Glucocorticoid-Responsive Region of the 11 β -HSD1 P2 Promoter

The experiments above strongly implicated members of the C/EBP family in the glucocorticoid response of the 11 β -HSD1 P2 promoter. EMSA with A549 nuclear

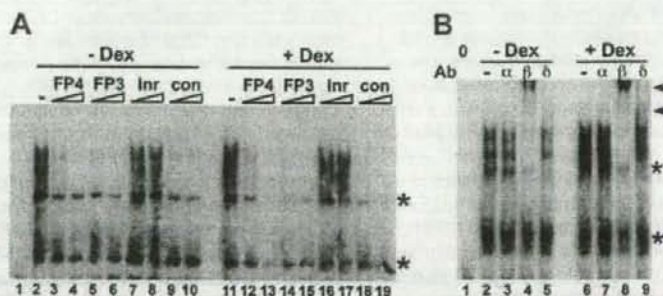


Fig. 4. C/EBP β in A549 Cells Binds to the Glucocorticoid-Responsive Region of the 11 β -HSD1 P2 Promoter

A. Representative competition EMSA showing complexes formed by A549 nuclear extracts on a double-stranded oligonucleotide encoding FP4 (0.1 pmol). Lane 1 contains no added protein. Lanes 2 and 11 contain 4 μ g nuclear extract from vehicle-treated (-Dex) and dexamethasone-treated (+Dex; 10^{-6} M, 24 h) cells, respectively. Addition of competitor oligonucleotides (5- or 50-fold molar excess) is indicated above the lanes. Oligonucleotides encoded FP4, FP3, the TdT initiator (Inr; to which C/EBP does not bind) (26), and a C/EBP consensus binding site (con) described previously (26). **B.** Representative EMSA showing presence of C/EBP β and C/EBP δ , but not C/EBP α , in complexes formed by 4 μ g nuclear extract from vehicle (-Dex) or dexamethasone (+Dex; 10^{-6} M) treated A549 cells on an oligonucleotide encoding FP4. The addition of C/EBP α (α), C/EBP β (β), C/EBP δ (δ), or no (-) antibody is indicated above the gel. The C/EBP β / δ supershifted complex is indicated by a black arrowhead. The first lane does not contain any added protein extract. Nonspecific complexes are indicated by asterisks.

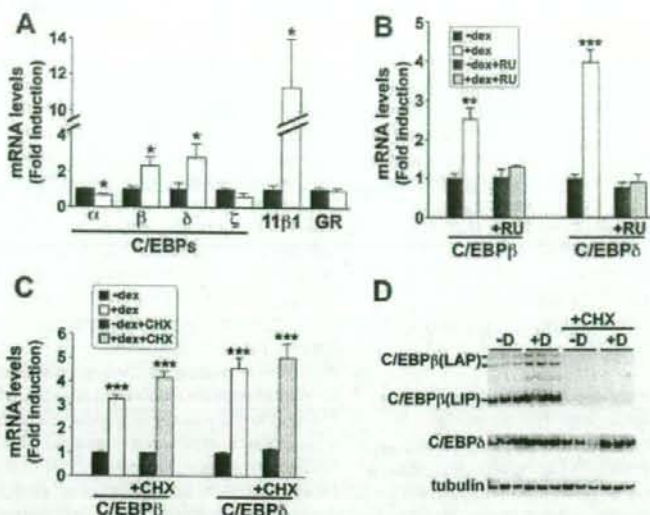


Fig. 5. Dexamethasone Increases C/EBP β and $-\delta$ Expression in A549 Cells

A–C, Real-time PCR measurement of levels of mRNAs encoding members of the C/EBP family in vehicle-treated A549 cells (black bars) or after 10^{-6} M dexamethasone treatment (white bars). Levels of mRNA are expressed as fold induction, relative to levels in vehicle-treated cells. Data are mean \pm SEM of three to 12 independent mRNA samples. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$. A, Levels of C/EBP β and C/EBP δ mRNAs were induced after 24 h dexamethasone treatment. B, The induction of C/EBP β and C/EBP δ was abolished by prior incubation with 10^{-5} M RU486 (RU), added 30 min before dexamethasone. Hatched bars, RU486; spotted bars, RU486 and dexamethasone. C, Cycloheximide (10^{-6} M), added 30 min before dexamethasone (4 h), had no effect on the induction of C/EBP β and C/EBP δ . Hatched bars, cycloheximide; spotted bars, cycloheximide, and dexamethasone. D, Representative Western blot, probed with C/EBP β , C/EBP δ , or tubulin antibody, of 20 μ g protein extract from triplicate samples of A549 cells treated for 24 h with vehicle (–D) or 10^{-6} M dexamethasone (+D), with or without cycloheximide (CHX), as indicated. Sizes of protein markers are shown on the right. Immunoreactive proteins corresponding to the LAP (38 and 35 kDa) and LIP (20 kDa) isoforms of C/EBP β are indicated.

extracts showed that dexamethasone increased complex formation on an oligonucleotide encoding FP4, without changing the pattern or relative intensities of the bands (Fig. 4). Complex formation was competed by excess unlabeled oligonucleotides encoding FP4, FP3, or an oligonucleotide encoding a consensus C/EBP binding site, but not by an oligonucleotide encoding the TdT initiator sequence (Fig. 4A), demonstrating the presence of proteins with C/EBP-like binding specificity in the complexes. Supershift with C/EBP-specific antisera showed C/EBP β present in a substantial proportion of the complexes, with C/EBP δ present in a minority (Fig. 4B). No binding by C/EBP α was observed in A549 extracts (Fig. 4B), although C/EBP α was present in protein-DNA complexes formed by liver nuclear extract (data not shown).

Dexamethasone Induces C/EBP β and C/EBP δ mRNAs as Primary Response Genes in A549 Cells

To determine whether C/EBP β and other members of the C/EBP family are regulated by glucocorticoids in A549 cells, real-time PCR was carried out to measure C/EBP α , $-\beta$, $-\delta$, and $-\zeta$ mRNA levels. Levels of C/EBP β

and $-\delta$ mRNA were increased after dexamethasone addition (Fig. 5A), and their induction was blocked by RU486 (Fig. 5B) but unaffected by cycloheximide (Fig. 5C). In contrast, levels of C/EBP α mRNA were decreased and C/EBP ζ mRNA levels were unchanged after dexamethasone (Fig. 5A). Dexamethasone did not affect levels of GR mRNA (Fig. 5A). Western blotting of whole-cell lysates of untreated A549 cells showed C/EBP β -immunoreactive proteins of 38, 35, and 20 kDa, corresponding to the liver-enriched activator protein (LAP) (38 and 35 kDa) and liver-enriched inhibitor protein (LIP) (20 kDa) forms of C/EBP β (31) (Fig. 5D). After dexamethasone, intensities of all bands were increased. Cycloheximide markedly reduced the intensities of all the C/EBP β -immunoreactive proteins, suggesting rapid turnover of the protein (Fig. 5D), consistent with reported data in myotubes (32). Similarly, levels of C/EBP δ were increased after dexamethasone but were unaffected by cycloheximide (Fig. 5D).

C/EBP β , But Not C/EBP δ , Is Required for the Dexamethasone Induction of 11 β -HSD1 mRNA

Transfection of A549 cells with small interfering RNA (siRNA) specific for C/EBP β or $-\delta$ mRNA decreased lev-

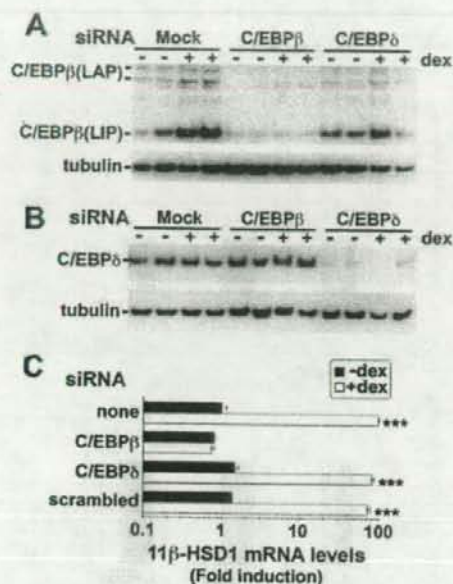


Fig. 6. Dexamethasone induction of 11 β -HSD1 is abolished by siRNA against C/EBP β but is unaffected by C/EBP δ siRNA.

A. Representative Western blot (20 μ g protein/lane) probed with C/EBP β antibody showing levels of C/EBP β protein (38-kDa LAP, 20-kDa LIP, and proteolytic products of LAP) 24 h after mock transfection (Mock) or transfection with 80 pmol C/EBP β siRNA (C/EBP β) or C/EBP δ siRNA (C/EBP δ) and concurrent vehicle (–) or dexamethasone (+D, 10^{–6} M) treatment. The blot was stripped and reprobed with tubulin antibody, as loading control. **B.** Western blot (20 μ g protein/lane) probed with C/EBP δ antibody showing levels of C/EBP δ protein 24 h after mock transfection (Mock) or transfection with C/EBP β siRNA (C/EBP β) or with C/EBP δ siRNA (C/EBP δ) and concurrent vehicle (–) or dexamethasone (+D, 10^{–6} M) treatment. The blot was stripped and reprobed with tubulin antibody as loading control. **C.** Real-time PCR measurement of levels of 11 β -HSD1 mRNA after mock transfection or transfection with C/EBP β , C/EBP δ , or scrambled siRNAs. Levels of mRNA in mock-transfected vehicle-treated cells are arbitrarily set to 1. Note logarithmic scale. Data are mean \pm SEM of at least three independent mRNA samples. ***, $P < 0.0001$.

els of the respective protein (Fig. 6). Importantly, C/EBP β siRNA abolished the dexamethasone induction of 11 β -HSD1 mRNA (Fig. 6C), consistent with a critical role for C/EBP β in the glucocorticoid response. In contrast, neither C/EBP δ nor scrambled siRNA had any effect on the levels of 11 β -HSD1 mRNA after dexamethasone, suggesting that C/EBP δ is redundant for the response.

C/EBP β Occupancy of the 11 β -HSD1 Promoter Is Increased after Dexamethasone

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays showed that after dexamethasone treatment of A549 cells,

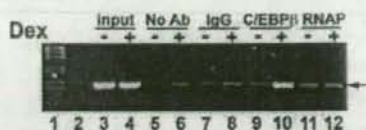


Fig. 7. C/EBP β occupancy of the 11 β -HSD1 promoter is increased after dexamethasone

Representative ChIP assay showing association of C/EBP β with the endogenous 11 β -HSD1 P2 promoter in A549 cells after 24 h treatment with 10^{–6} M dexamethasone. PCR (35 cycles) were carried out with primers spanning FP3 and FP4 on DNA after immunoprecipitation with control IgG (lanes 7 and 8), C/EBP β antiserum (lanes 9 and 10), RNA polymerase II antiserum (RNAP; lanes 11 and 12) or after control precipitations with no antibody (No Ab, lanes 5 and 6). Lane 1 contains marker, and lane 2 a PCR carried out with water as negative control. Lanes 3 and 4 show input DNA (1%) from vehicle-treated or dexamethasone-treated cells, respectively. The assay shown is representative of two independent assays.

there was a marked increase in C/EBP β binding to FP3 and FP4 in the endogenous 11 β -HSD1 gene (Fig. 7). There was little or no association of C/EBP β with the promoter in vehicle-treated cells, with levels of PCR product similar to those in control ChIP reactions with IgG or RNA polymerase II (not predicted to bind to the FP3/FP4 region of the 11 β -HSD1 P2 promoter) (Fig. 7).

Overexpression of C/EBP β in A549 Cells Increases 11 β -HSD1 P2 Promoter Activity and Blocks Further Induction by Dexamethasone

To investigate whether overexpression of C/EBP β mimics or alters the response of the 11 β -HSD1 promoter to dexamethasone, A549 cells were cotransfected with 11 β -HSD1 promoter-reporter plasmid and C/EBP β , C/EBP δ , or both together. C/EBP β increased basal expression of the promoter (Fig. 8), consistent with previous data in hepatoma cells showing C/EBP β activates the 11 β -HSD1 promoter, albeit weakly when compared with C/EBP α (26). However, it markedly attenuated the dexamethasone response (Fig. 8). In contrast, whereas there was a trend for C/EBP δ to decrease basal promoter activity, this did not achieve significance, nor did C/EBP δ affect the magnitude of the dexamethasone induction (Fig. 8). However, when C/EBP β and C/EBP δ were cotransfected, basal activity was indistinguishable from control levels, and the dexamethasone induction was abrogated.

Glucocorticoid Treatment *In Vivo* Increases 11 β -HSD1 and C/EBP β Expression in Adipose Tissue

To explore whether a similar mechanism could underlie glucocorticoid regulation of 11 β -HSD1 in adipose tissue, we measured 11 β -HSD1, C/EBP β , and C/EBP δ mRNA levels in adipose tissue and liver of *Pomc*^{–/–} mice (congenitally deficient in glucocorticoids) that had been treated for 10 d with corticosterone added to

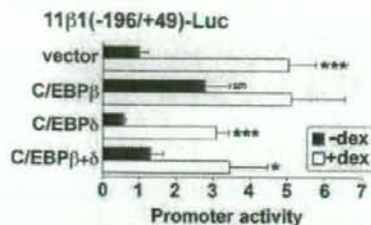


Fig. 8. Overexpression of C/EBP β Blocks the Effect of Glucocorticoid on the 11 β -HSD1 P2 Promoter

Ectopic expression of C/EBP β increased basal promoter activity and attenuated the dexamethasone response of the 11 β -HSD1 P2 promoter in transiently transfected A549 cells. Ectopic expression of C/EBP δ had no effect. In each transfection, 1×10^5 cells were seeded per well in six-well plates and transfected with 250 ng 11 β 1(-196/+49), 250 ng pRSV-lacZ (internal control), and 50 ng C/EBP expression plasmid or empty vector. Promoter activity is expressed as luciferase/ β -galactosidase (internal control) activity. Data are expressed relative to vehicle-treated 11 β 1(-196/+49) cotransfected with empty vector (vector; arbitrarily set to 1) and are mean \pm SEM of at least three experiments, each carried out in triplicate. *, Significantly different from vehicle-treated control, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0001$. §, Significantly different from vector, $P < 0.05$.

their drinking water. We have previously shown that this regime increased 11 β -HSD1 expression in adipose tissue of *Pomc*^{-/-} as well as wild-type mice (although the magnitude of the increase was lower in the latter because of higher basal levels), whereas liver 11 β -HSD1 expression did not differ between genotypes or with corticosterone treatment (25). Corticosterone increased both 11 β -HSD1 and C/EBP β mRNA levels in adipose tissue of *Pomc*^{-/-} mice, whereas C/EBP δ mRNA levels were unaffected. Consistent with previous data (25), glucocorticoid treatment had no effect on hepatic 11 β -HSD1 expression, although C/EBP β mRNA levels were decreased (Fig. 9B). Thus, it is possible that C/EBP β may play a role in the tissue-specific glucocorticoid regulation of 11 β -HSD1 *in vivo*.

DISCUSSION

There are many reports of glucocorticoid induction of 11 β -HSD1 mRNA levels (8, 15–25). Here we have shown that glucocorticoids increase endogenous expression of 11 β -HSD1 in A549 cells in a GR-dependent manner, suggesting the validity of these cells as a model of this control. The time course and inhibition by cycloheximide are both consistent with indirect regulation, paralleling previous findings in primary human fibroblasts (15). Glucocorticoid regulation of the 11 β -HSD1 P2 promoter required an approximately 110-bp glucocorticoid-responsive region located close to the transcription start that contains two binding sites for C/EBP transcription factors FP3 and FP4,

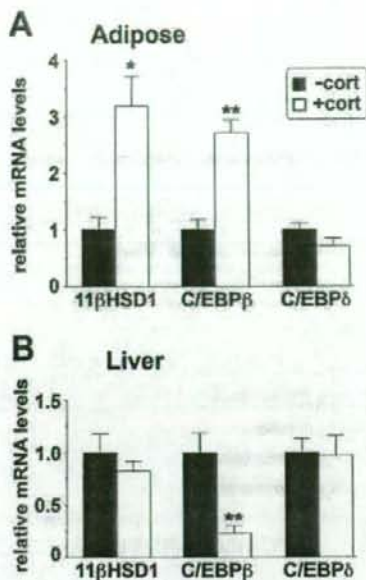


Fig. 9. Increased C/EBP β mRNA Levels Are Associated with Increased 11 β -HSD1 mRNA Levels in Adipose Tissue of Glucocorticoid-Treated *Pomc*^{-/-} Mice

Real-time PCR measurement of levels of mRNAs encoding 11 β -HSD1, C/EBP β , and C/EBP δ in retroperitoneal adipose tissue (A) or liver (B) of *Pomc*^{-/-} mice (black bars) or after 10 d treatment with corticosterone in their drinking water (25 μ g/ml) (white bars) as described (25, 66). Levels of mRNA are expressed relative to levels in untreated mice, arbitrarily set to 1. Data are mean \pm SEM; $n = 4$ –6 per group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$.

together essential for the glucocorticoid induction of promoter activity. Mutation of the only sequence resembling a GR binding site (located between FP3 and FP4, within the glucocorticoid-responsive region) had no effect upon the glucocorticoid response. Thus, it is unlikely that DNA binding by GR to the 11 β -HSD1 promoter plays any part in the regulation of 11 β -HSD1 transcription by glucocorticoids.

Many studies have linked glucocorticoid action to the C/EBP family of transcription factors. In some cases, C/EBPs interact with GR upon target gene promoters, but in others, C/EBPs, primarily C/EBP β , mediate the effect of glucocorticoids upon genes that lack GR binding sites. For example, PECK and TAT, classical glucocorticoid-target genes in liver, both depend upon C/EBP binding sites in addition to GR binding sites for their glucocorticoid response (33–35). Genes induced during the acute-phase response, such as that encoding α_1 -acid glycoprotein, typically are dependent upon C/EBP-binding sites adjacent to GR binding sites for full activation (36, 37). As well as synergizing with GR, levels of C/EBP mRNAs are regulated by glucocorticoids. C/EBP β and C/EBP δ are induced by glucocorticoids in a

variety of cell types (38–44) and mediate glucocorticoid effects. The increase in arginase expression in hepatocytes after glucocorticoid is indirect and mediated by C/EBP β (42), and in H441 lung epithelial cells, glucocorticoid induction of Clara cell secretory protein and cytochrome P450 2B1 depends upon C/EBP β (45, 46). Indeed, it has been suggested that glucocorticoid enhancement of local innate host defense mechanisms are mediated via C/EBP β , in contrast to the antiinflammatory mechanisms of glucocorticoids, which are predominantly mediated through interference with nuclear factor- κ B and activator protein-1 function (47).

Here, we have shown that C/EBP β is indispensable for the glucocorticoid regulation of 11 β -HSD1. Both C/EBP β and δ were increased by glucocorticoid treatment of A549 cells, although C/EBP δ was not required for the glucocorticoid induction of 11 β -HSD1. This is consistent with the predominant binding of C/EBP β to the promoter *in vitro*, with C/EBP δ present in only a minority of complexes. Interestingly, despite the clear presence of C/EBP β in nuclear extracts of untreated A549 cells, little or none was associated with the 11 β -HSD1 promoter before dexamethasone treatment, suggesting that glucocorticoids may exert effects on C/EBP β (e.g. regulation of posttranslational modification) additional to the increase in expression. Previous work has established the central role of C/EBPs in the regulation of 11 β -HSD1 transcription (26–28). Moreover, C/EBP β mediates the cAMP induction of 11 β -HSD1 in preadipocytes, acting through the same region of the promoter (–186 to –113) as identified here (28). Indeed, other regulators of 11 β -HSD1 (peroxisome proliferator-activated receptor- α and γ and liver X receptor- α) are likely to act indirectly (48–50), possibly through members of the C/EBP family.

Exogenous C/EBP β mimicked the effect of dexamethasone and blocked further induction by glucocorticoid. The increased basal activity of the 11 β -HSD1 promoter with exogenous C/EBP β is consistent with previous findings (26). The magnitude of the effect was less than the endogenous gene response to glucocorticoid, suggesting that exogenous C/EBP may titrate a modulator/effector of C/EBP β action. The nature of this factor is unknown but could be a coactivator, heterodimerization partner, or posttranslational modification. C/EBP α heterodimerizes with C/EBP β , and we have previously shown C/EBP α to be a strong activator of 11 β -HSD1, including in A549 cells (27). Indeed, overexpression of C/EBP α both markedly increased basal expression of the 11 β -HSD1 promoter and abolished the response to dexamethasone (unpublished observations). However, A549 cells are reported to lack endogenous C/EBP α (51), and although we detected the presence of C/EBP α mRNA in A549 cells, levels were very low (unpublished observations) and were decreased by dexamethasone, whereas C/EBP β mRNA levels were high in these cells. Similarly, whereas C/EBP β protein was readily detected in A549 nuclear extracts, C/EBP α was not detected.

C/EBP β is subject to extensive posttranscriptional regulation (31). Alternate translation starts (52, 53) as well as regulated proteolysis (32, 54, 55) generate the higher molecular weight LAP and 20-kDa LIP isoforms, and the translated protein is phosphorylated on several sites, reportedly regulating its DNA-binding activity, nuclear localization, and transcriptional activity (reviewed in Ref. 31). In our experiments, all isoforms of C/EBP β (LAP and LIP) were similarly regulated by glucocorticoids. However, because the LIP/LAP ratio depended upon the protein extraction method (unpublished observations), it is likely that the detected LIP arose at least in part from *in vitro* proteolysis, consistent with previous reports (55), although we cannot exclude a role for the LIP/LAP ratio in the regulation of the 11 β -HSD1 promoter.

Thus, in cells in which C/EBP α is highly expressed, such as hepatocytes, it may be the dominant (positive) regulator of the P2 promoter of 11 β -HSD1. This is consistent with our data in liver of *Pomc*^{–/–} mice, in which glucocorticoid status had no effect on the level of 11 β -HSD1 expression. In other cell types, including adipose tissue, C/EBP β may be a dynamic regulator of 11 β -HSD1 transcription in response to signaling by glucocorticoids (as shown here) or by inflammatory or innate host defense mediators that signal through C/EBP β (56). Indeed, 11 β -HSD1 may mediate some of the adverse metabolic effects of C/EBP β . Like 11 β -HSD1-deficient mice (57, 58), C/EBP β ^{–/–} mice are insulin sensitized (59) and resist the adverse metabolic effects of a high-fat diet (60, 61). C/EBP β deficiency also reduces obesity, fatty liver disease, and diabetes in genetically obese diabetic *Lep*^{db/db} mice (62). Moreover, it has been recently reported that C/EBP β ^{–/–} mice show a marked reduction in pulmonary fibrosis in a bleomycin-induced mouse model of lung disease (63). It will be intriguing to determine the impact of 11 β -HSD1 deficiency in this model.

The region of the 11 β -HSD1 promoter that binds C/EBP β and mediates the glucocorticoid (and cAMP) (28) response is highly conserved between the rodent and human genes (50/51 nucleotide identity), suggesting conservation of this regulation in humans. The central role of the C/EBPs in the regulation of 11 β -HSD1 transcription (26, 27), and that of C/EBP β in the hormone responsiveness of the gene (28) (this work), suggest that they may be critical in coordinating signaling from the diverse nutrient, hormonal, and inflammatory regulators of 11 β -HSD1.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture, RNA Extraction, and Analysis

A549 cells were maintained as previously described (27). Dexamethasone (10^{–6} M, unless stated otherwise) treatment was for 24 h (unless stated otherwise). Cycloheximide (10^{–5} M) or RU38486 (RU486; 10^{–6} M) were added 30

min before dexamethasone or vehicle and cells harvested 4 or 24 h later. RNA was extracted after homogenization in Trizol (Invitrogen, Paisley, UK) and was resuspended in ribonuclease-free water. RNA levels were quantified by real-time PCR. Reverse transcription was carried out as previously described (64) using 2 μ g RNA. PCR was carried out on a LightCycler 480, according to the manufacturer's instructions. Mastermix and primer-probe sets for 18S, 11 β -HSD1, TBP, GAPDH, C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , and C/EBP ζ were purchased from Applied Biosystems (Warrington, UK). Routinely, at least two internal standards were used from among 18S, TBP, and GAPDH. Similar data were obtained with all internal standards, and none varied with dexamethasone treatment (data not shown).

11 β -HSD1 Assay

11 β -HSD1 was assayed in intact cells by measuring conversion of 200 nM cortisone, containing trace amounts of [3 H]cortisone, to cortisol, as previously described (64).

Transfections

A549 cells were maintained and transfected as previously described (27). Briefly, cells were seeded at 1.5×10^5 cells per well of a six-well plate and transfected the after day using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 250 ng test plasmid, 250 ng pRSV-LacZ (as internal control), and where appropriate, 50 ng pMSV-C/EBP β , pMSV-C/EBP δ (gifts from S. McKnight and W.-C. Yeh), or pMSV vector. Dexamethasone (10^{-6} M, unless stated otherwise) or vehicle was added 1–4 h after transfection. Transfections were carried out in triplicate, and each experiment was repeated up to five times.

Reporter plasmids were as follows. A 5' deletion series of the rat 11 β -HSD1 P2 promoter has been described previously (26) and is designated 11 β 1(5'-end/3'-end). In some experiments, an identical deletion series subcloned into an alternative reporter vector, pGL3-Basic (Promega, Southampton, UK), was used. Other plasmids comprise an internal deletion series of 11 β 1(-1799/+49), designated Δ (5'-end/3'-end) or deletion/3'-end (point of deletion) and a series of fragments of the rat 11 β -HSD1 promoter subcloned into pGL2-promoter, designated P(-196/-88)_n, where n indicates the number of copies of the -196/-88 fragment inserted. Derivatives of 11 β 1(-196/+49) with mutations in FP3, FP4, or both FP3 and FP4 have been described previously (26). Mutation of the putative GRE between FP3 and FP4, changing the sequence 5'-TGGAGTAAACATGTGC-CATTA-3' (nucleotides matching the GRE consensus (65) are underlined) to 5'-TGGACCGTTATCCAGGATTA-3' (mutated nucleotides underlined) was carried out using a QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's instructions; all constructs were verified by sequencing.

For siRNA transfections, 7.5×10^4 cells were seeded per well of a 12-well plate and transfected the following day with 80 pmol siRNA using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. Dexamethasone (10^{-6} M) or vehicle was added 1–4 h after transfection and cells harvested 24 h later for RNA extraction or Western analysis. Transfections were carried out in triplicate and repeated at least twice. siRNAs were purchased from Applied Biosystems (Warrington, UK) and were scrambled siRNA (AM4611 negative control 1), C/EBP β (ID 114495), and C/EBP δ (ID 45106).

Nuclear Extracts and EMSA

Nuclear extracts were prepared from liver or A549 cells as previously described (26). A549 cells were treated with 10^{-6} M dexamethasone or vehicle for 24 h before harvesting for extracts. EMSA were carried out as previously described

using 0.1 pmol 32 P-labeled double-stranded oligonucleotide encoding FP4 (top strand, 5'-GTTGCTCTTACTCAAT-GAAATGGAGTAAA-3'; bottom strand, 5'-TTTACTCCATT-TCATTGAGTAAGAGG-3'), with 5 μ g added protein extract. DNA was end labeled with 32 P using the Klenow fragment of DNA polymerase I as described (26). Competition assays were carried out as previously described (26) using a 5- or 50-fold molar excess of competitor oligonucleotide encoding FP4, FP3 (top, 5'-ATTGTCCATTATGAAATCCATCAGC-CAGG-3'; bottom, 5'-GCCGTGCGTGATGGATTCATAAT-GGA-3'), the TdT initiator (26) or a C/EBP consensus binding site (26). For antibody supershift assays, 1 μ l C/EBP α antiserum, C/EBP β antiserum, or C/EBP δ antiserum (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) was included in the preincubation before addition of 32 P-labeled DNA.

Western Analysis

Cells were lysed in 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulfate, and 10% glycerol. Electrophoresis was carried out on 12% NuPage Bis-tris gels (Life Technologies) with 20 μ g protein loaded. After transfer, blots were probed with antibodies to C/EBP β or - δ at 1:500 dilution or tubulin at 1:2000 dilution (Santa Cruz Biotechnology).

ChIP Assays

ChIP assays were carried out using an Upstate EZ ChIP kit (Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, A549 cells were grown to confluence in 10-cm dishes, then treated with 10^{-6} M dexamethasone or vehicle for 24 h. Proteins were cross-linked to DNA by incubation in 1% formaldehyde, and then cells were lysed in sodium dodecyl sulfate lysis buffer (provided in the kit). Chromatin was sheared by sonication using a Soniprep 150 (MSE; Beckenham, Kent, UK) with seven 10-sec pulses, at maximal amplitude. Immunoprecipitations were carried out with 5 μ g C/EBP antiserum or control antibodies (rabbit IgG or anti-RNA polymerase II) supplied with the kit. One percent of the immunoprecipitation reaction was reserved as input. After reversal of cross-linking, 35 cycles of PCR (94 C for 30 sec, 56 C for 1 min, and 72 C for 1 min) were carried out with primers spanning FP3 and FP4: 5'-AGTCCTGTACAGTCAT-GAGCTTGG-3' and 5'-ATTTCCCTGTGAGCAGCGATTG-3'.

Pomc^{-/-} Mice and Glucocorticoid Treatment

The generation and corticosterone treatment of *Pomc*^{-/-} mice has been described previously (25, 66). Mice were housed in standard conditions on a 12-h light, 12-h dark cycle (lights on 0700 h) with *ad libitum* access to water and chow (4.5% fat diet; Special Diet Services, Witham, UK). Eight-week-old male mice were treated for 10 d with corticosterone (25 μ g/ml) in their drinking water (66). RNA was extracted from adipose tissue and liver as described previously (25). All animal protocols used in these studies were approved under the auspices of the United Kingdom Home Office Animals (Scientific Procedures) Act, 1986.

Statistics

Data were analyzed using *t* tests or by ANOVA followed by *post hoc* Fisher least significant difference. Significance was set at $P < 0.05$. Values are mean \pm SEM.

Acknowledgments

We thank members of the Endocrinology Unit, Queen's Medical Research Institute, for helpful comments and discussions.

Received October 24, 2007. Accepted June 30, 2008.

Address all correspondence and requests for reprints to: Karen E. Chapman, Endocrinology Unit, Centre for Cardiovascular Sciences, Queen's Medical Research Institute, 47 Little France Crescent, Edinburgh EH16 4TJ, United Kingdom. E-mail: Karen.Chapman@ed.ac.uk

This work was supported by a Wellcome Trust Programme grant (J.R.S. and K.E.C.) and by the European Union 6th Framework Programme DIABESITY. S.S. was the recipient of a grant from the Great Britain Sasakawa Foundation.

Disclosure Statement: S.S., C.L.E., V.K., Z.M., K.A., A.P.C., Y.N., T.O., and K.E.C. have nothing to declare. J.R.S. has consulted for Incyte, Vitae Pharmaceuticals, Ipsen, and Janssen.

References

- Seckl JR 2004 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharmacol* 4:597–602
- Orth DN 1995 Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 332:791–803
- Rask E, Olsson T, Söderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, Walker BR 2001 Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1418–1421
- Paulmyer-Lacroix O, Boullu S, Oliver C, Alessi MC, Grino M 2002 Expression of the mRNA coding for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an *in situ* hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2701–2705
- Wake DJ, Rask E, Livingstone DE, Soderberg S, Olsson T, Walker BR 2003 Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3983–3988
- Rask E, Walker BR, Soderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, Andrew R, Olsson T 2002 Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3330–3336
- Lindsay RS, Wake DJ, Nair S, Bunt J, Livingstone DE, Permana PA, Tataranni PA, Walker BR 2003 Subcutaneous adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic acid levels are associated with adiposity and insulinemia in Pima Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2738–2744
- Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Heintze U, Janke J, Luft FC, Sharma AM 2004 Regulation of 11 β -HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. *Obes Res* 12:9–17
- Kannisto K, Pietiläinen KH, Ehrenborg E, Rissanen A, Kaprio J, Hamsten A, Yki-Jarvinen H 2004 Overexpression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 in adipose tissue is associated with acquired obesity and features of insulin resistance: studies in young adult monozygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4414–4421
- Desbrière R, Vuaroqueaux V, Achard V, Boullu-Ciocca S, Labuhn M, Doutour A, Grino M 2006 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients. *Obesity* 14:794–798
- Goedecke JH, Wake DJ, Levitt NS, Lambert EV, Collins MR, Morton NM, Andrew R, Seckl JR, Walker BR 2006 Glucocorticoid metabolism within superficial subcutaneous rather than visceral adipose tissue is associated with features of the metabolic syndrome in South African women. *Clin Endocrinol* 65:81–87
- Michailidou Z, Jensen MD, Dumesic DA, Chapman KE, Seckl JR, Walker BR, Morton NM 2007 Omental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity. *Obesity* 15:1155–1163
- Paulsen SK, Pedersen SB, Fisker S, Richelsen B 2007 11 β -HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization. *Obesity* 15:1954–1960
- Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR 2004 Glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog Horm Res* 59:359–383
- Hammami MM, Silteri PK 1991 Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J Clin Endocrinol Metab* 73:326–334
- Jamieson PM, Chapman KE, Edwards CRW, Seckl JR 1995 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 β -reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* 136:4754–4761
- Whorwood CB, Donovan SJ, Wood PJ, Phillips DJ 2001 Regulation of glucocorticoid receptor α and β isoforms and type I 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab* 86:2296–2308
- Sun K, He P, Yang K 2002 Intracrine induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by glucocorticoid potentiates prostaglandin production in the human chorionic trophoblast. *Biol Reprod* 67:1450–1455
- Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Bartlett WA, Hewison M, Stewart PM 2002 Osteoblastic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Miner Res* 17:979–986
- Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM 1999 Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140:3188–3196
- Yang K, Berduco ETM, Challis JRG 1994 Opposite effects of glucocorticoid on hepatic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and activity in fetal and adult sheep. *J Endocrinol* 143:121–126
- Hundertmark S, Ragošch V, Schein B, Buhler H, Lorenz U, Fromm M, Weitzel HK 1994 Gestational age dependence of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the enzymes of phosphatidylcholine synthesis in lung and liver of fetal rat. *Biochim Biophys Acta* 1210:348–354
- Jamieson PM, Chapman KE, Seckl JR 1999 Tissue- and temporal-specific regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by glucocorticoids *in vivo*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68:245–250
- Jellinck PH, Dhabhar FS, Sakai RR, McEwen BS 1997 Long-term corticosteroid treatment but not chronic stress affects 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I activity in rat brain and peripheral tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60:319–323
- Michailidou Z, Coll AP, Kenyon CJ, Morton NM, O'Rahilly S, Seckl JR, Chapman KE 2007 Peripheral mechanisms contributing to the glucocorticoid hypersensitivity in proopiomelanocortin null mice treated with corticosterone. *J Endocrinol* 194:161–170
- Williams LJS, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE 2000 C/EBP regulates hepatic transcription of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a novel mechanism for cross talk between the C/EBP and glucocorticoid signalling pathways. *J Biol Chem* 275:30232–30239
- Bruley C, Lyons V, Worsley AG, Wilde MD, Darlington GD, Morton NM, Seckl JR, Chapman KE 2006 A novel promoter for the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is active in lung and is C/EBP α independent. *Endocrinology* 147:2879–2885

28. Gout J, Tirard J, Thevenon C, Riou JP, Begeot M, Naville D 2006 CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) regulate the basal and cAMP-induced transcription of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase encoding gene in adipose cells. *Biochimie* 88:1115–1124
29. Ballard PL, Mason RJ, Douglas WH 1978 Glucocorticoid binding by isolated lung cells. *Endocrinology* 102:1570–1575
30. Wang JC, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Ha C, Yamamoto KR 2004 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15603–15608
31. Roesler WJ 2001 The role of C/EBP in nutrient and hormonal regulation of gene expression. *Annu Rev Nutr* 21:141–165
32. Wei W, Yang H, Cao P, Menconi M, Chamberlain C, Petkova V, Hasselgren PO 2006 Degradation of C/EBP β in cultured myotubes is calpain-dependent. *J Cell Physiol* 208:386–398
33. Yamada K, Duong DT, Scott DK, Wang JC, Granner DK 1999 CCAAT/enhancer-binding protein β is an accessory factor for the glucocorticoid response from the cAMP response element in the rat phosphoenolpyruvate carboxylase gene promoter. *J Biol Chem* 274:5880–5887
34. Arizmendi C, Liu S, Croniger C, Poli V, Friedman JE 1999 The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein β regulates gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxylase (GTP) gene transcription during diabetes. *J Biol Chem* 274:13033–13040
35. Grange T, Roux J, Rigaud G, Pictet R 1991 Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res* 19:131–139
36. Alam T, An MR, Mifflin RC, Hsieh CC, Ge X, Papaconstantinou J 1993 *trans*-activation of the α 1-acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268:15681–15688
37. Baumann H, Gauldie J 1994 The acute phase response. *Immunol Today* 15:74–80
38. MacDougald OA, Cornelius P, Lin FT, Chen SS, Lane MD 1994 Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein α and δ genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *J Biol Chem* 269:19041–19047
39. Boudreau F, Blais S, Asselin C 1996 Regulation of CCAAT/enhancer binding protein isoforms by serum and glucocorticoids in the rat intestinal epithelial crypt cell line IEC-6. *Exp Cell Res* 222:1–9
40. Tomlinson JJ, Boudreau A, Wu D, Atlas E, Hache RJ 2006 Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids. *Endocrinology* 147:5284–5293
41. Matsuno F, Chowdhury S, Gotoh T, Iwase K, Matsuzaki H, Takatsuki K, Mori M, Takiguchi M 1996 Induction of the C/EBP β gene by dexamethasone and glucagon in primary-cultured rat hepatocytes. *J Biochem* 119:524–532
42. Gotoh T, Chowdhury S, Takiguchi M, Mori M 1997 The glucocorticoid-responsive gene cascade. Activation of the rat arginase gene through induction of C/EBP β . *J Biol Chem* 272:3694–3698
43. Yang H, Mammen J, Wei W, Menconi M, Evenson A, Fareed M, Petkova V, Hasselgren PO 2005 Expression and activity of C/EBP β and δ are upregulated by dexamethasone in skeletal muscle. *J Cell Physiol* 204:219–226
44. Woltje M, Tschoke B, von Bulow V, Westenfeld R, Denecke B, Graber S, Jahnke-Dechert W 2006 CCAAT enhancer binding protein β and hepatocyte nuclear factor 3 β are necessary and sufficient to mediate dexamethasone-induced up-regulation of α 2HS-glycoprotein/fetuin-A gene expression. *J Mol Endocrinol* 36:261–277
45. Berg T, Didon L, Barton J, Andersson O, Nord M 2005 Glucocorticoids increase C/EBP β activity in the lung epithelium via phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 334:638–645
46. Berg T, Cassel TN, Schwarze PE, Nord M 2002 Glucocorticoids regulate the CCSP and CYP2B1 promoters via C/EBP β and δ in lung cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293:907–912
47. Zhang N, Truong-Tran QA, Tancowry B, Harris KE, Schleimer RP 2007 Glucocorticoids enhance or spare innate immunity: effects in airway epithelium are mediated by CCAAT/enhancer binding proteins. *J Immunol* 179:576–589
48. Hermanowski-Vosatka A, Gerhold D, Mundt SS, Loving VA, Lu M, Chen Y, Elbrecht A, Wu M, Doebber T, Kelly L, Milot D, Guo Q, Wang PR, Ippolito M, Chao YS, Wright SD, Thieringer R 2000 PPAR α agonists reduce 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 279:330–336
49. Berger J, Tanen M, Elbrecht A, Hermanowski-Vosatka A, Moller DE, Wright SD, Thieringer R 2001 PPAR γ ligands inhibit adipocyte 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *J Biol Chem* 276:12629–12635
50. Stulnig TM, Oppermann U, Steffensen KR, Schuster GU, Gustafsson JA 2002 Liver X receptors downregulate 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *Diabetes* 51:2426–2433
51. Li F, Rosenberg E, Smith CI, Notarfrancesco K, Reisher SR, Shuman H, Feinstein SI 1995 Correlation of expression of transcription factor C/EBP α and surfactant protein genes in lung cells. *Am J Physiol* 269:L241–L247
52. Descombes P, Schibler U 1991 A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67:569–579
53. Xiong W, Hsieh CC, Kurtz AJ, Rabek JP, Papaconstantinou J 2001 Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein- β isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nucleic Acids Res* 29:3087–3098
54. Burgess-Beusse BL, Timchenko NA, Darlington GJ 1999 CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) is an important mediator of mouse C/EBP β protein isoform production. *Hepatology* 29:597–601
55. Baer M, Johnson PF 2000 Generation of truncated C/EBP β isoforms by *in vitro* proteolysis. *J Biol Chem* 275:26582–26590
56. Poli V 1998 The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273:29279–29282
57. Morton NM, Holmes MC, Flévet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR 2001 Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem* 276:41293–41300
58. Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, Holmes MC, Staels B, Flévet C, Walker BR, Flier JS, Mullins JJ, Seckl JR 2004 Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice. *Diabetes* 53:931–938
59. Wang L, Shao J, Muhlenkamp P, Liu S, Klepcyk P, Ren J, Friedman JE 2000 Increased insulin receptor substrate-1 and enhanced skeletal muscle insulin sensitivity in mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein- β . *J Biol Chem* 275:14173–14181
60. Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, Chu EC, Bederian IR, Gilge DA, Previs SF, Croniger CM 2007 Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein β are protected against diet-induced obesity. *Diabetes* 56:161–167

61. Rahman SM, Schroeder-Gloekler JM, Janssen RC, Jiang H, Qadri I, Maclean KN, Friedman JE 2007 CCAAT/enhancing binding protein β deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45:1108–1117
62. Schroeder-Gloekler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, Fischer SJ, Lowe E, Orlicky DJ, McManaman JL, Palmer C, Gitomer WL, Huang W, O'Doherty RM, Becker TC, Klemm DJ, Jensen DR, Pulawa LK, Eckel RH, Friedman JE 2007 CCAAT/enhancer-binding protein β deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in *Lepr(db/db)* mice. *J Biol Chem* 282:15717–15729
63. Hu B, Ullenbruch MR, Jin H, Gharaee-Kermani M, Phan SH 2007 An essential role for CCAAT/enhancer binding protein β in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Pathol* 211:455–462
64. Gilmour JS, Coutinho AE, Cailhier JF, Man TY, Clay M, Thomas G, Harris HJ, Mullins JJ, Seckl JR, Savill JS, Chapman KE 2006 Local amplification of glucocorticoids by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* 176:7605–7611
65. Beato M 1987 Induction of transcription by steroid hormones. *Biochim Biophys Acta* 910:95–102
66. Coll AP, Challis BG, Lopez M, Piper S, Yeo GS, O'Rahilly S 2005 Proopiomelanocortin-deficient mice are hypersensitive to the adverse metabolic effects of glucocorticoids. *Diabetes* 54:2269–2276



Molecular Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

小児期メタボリックシンドロームの診断基準と 食事療法における魚介類の有用性

東京都立広尾病院 小児科 部長 原 光彦

はじめに

メタボリックシンドローム(以下MetSと略)診断の意義は、心血管病や2型糖尿病の予防である¹⁾。MetSは、動脈硬化を強力に促進させる病態として知られ、小児期からすでに始まっている。わが国では、1970年から2000年までの30年間に、肥満度+20%以上の肥満傾向児は2~3倍に増加し、小学生高学年では10人に1人は肥満である。2000年以降は、増加傾向に歯止めがかかったかに見えるが、高度肥満や痩せが増加しており、子供たちの体格が望ましい方向に向かっていない²⁾。

本稿では、最近策定された小児期MetSの診断基準を紹介するとともに、小児期MetSと早期動脈硬化の関係やMetS治療の際の食品選択の重要性に関して解説したい。

小児期MetSの診断基準

単純性肥満は、健康障害のない「肥満」、肥満に伴う健康障害を有するかその危険性が高い「肥満症」、肥満に複数の動脈硬化危険因子が集積した「MetS」の3種類に分けられる。この中で、MetSは最も治療介入が必要な肥満であり、小児期からの対応が望まれる。

表1に厚生労働省の大関班が策定した、小児期MetSの診断基準を示す³⁾。この診断基準は5~15歳に適用され、それぞれの構成要素(動脈硬化危険因子)の基準値は小児にとって適切な値となるよう配慮されている。小児期MetSの診断法は、成人MetSと同様に、腹部肥満を必須項目として、血清脂質異常、血圧高値、空腹時高血糖の3つの危険因子のうち2つ以上の危険因子が特定の個人に集積している場合にMetS

とする。

小児期MetSの頻度は、一般学童の1~2%、肥満度+30%以上を対象とした肥満児検診受診者の約20%、当院の小児生活習慣病外来受診者の33%に認められる。

小児期MetSと早期動脈硬化

成人では肥満に伴う健康障害の発症機序として、脂肪細胞から分泌される生理活性物質であるアディポサイトカインのアンバランスが重視されている。すなわち、エネルギーバランスが正となると、過剰なエネルギーは中性脂肪(TG)として脂肪細胞内に蓄積され、脂肪細胞は肥大・増殖する。肥大した脂肪細胞、特に腸間膜周囲に蓄積した、いわゆる内臓脂肪は、糖代謝異常と関連があるTNF α や高血圧のアングiotenシン、血清脂質異常の原因となるFFA、血栓形成に関与するPAI-1を盛んに分泌する。一方、抗動脈

硬化作用やインスリン抵抗性改善作用を有する善玉のアディポネクチンの分泌は減少する。その結果、動脈硬化が進行して心血管イベントが発生する。肥満に伴うアディポサイトカインのアンバランスは、肥満学童にも既に認められている。

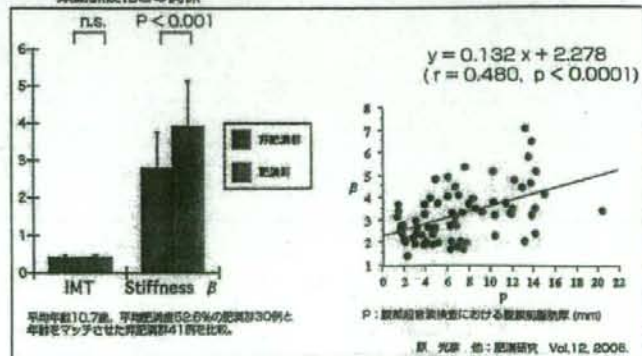
当院の小児生活習慣病外来受診者を対象とした研究によれば、肥満学童の総頸動脈には、非肥満小児と比較して、Stiffnessの亢進が認められており、頸動脈硬化の程度と腹部超音波検査で得られる内臓脂肪蓄積の指標である腹膜前脂肪厚との間には正相関が認められた⁴⁾。なお、成人領域における早期動脈硬化指標として、最も汎用されている内臓中膜複合体厚

表1 小児期メタボリックシンドロームの診断基準

(1) 項目	50 cm以上 ⁽¹⁾
(2) 血清脂質	中総脂肪 120 mg/dl 以上 かつ/または HDLコレステロール 40 mg/dl 未満
(3) 血圧	収縮期血圧 125 mmHg 以上 かつ/または 拡張期血圧 70 mmHg 以上
(4) 空腹時血糖	100 mg/dl 以上

(1) があり (2)~(4) のうち2項目を有する場合にメタボリックシンドロームと診断する。
(2) 空腹時CPTG、総脂肪量FDL、HDL-C、中総脂肪量、HDL-Cのいずれか1項目が正常値である。

図1 肥満の有無による総頸動脈 IMTや Stiffness β の比較と内臓脂肪蓄積と頸動脈硬化との関係



(Intima-media thickness:IMT)は肥満の有無で有意差はなかった(図1)。イタリアの研究者からも、MetS小児の頸動脈にはStiffnessの亢進が認められたという報告がなされており⁹⁾、MetSの病態は、小児期から動脈硬化を進行させることは明らかである。

小児期MetSに対する介入・治療

小児期MetSに対する治療や介入の基本は、正常な発育を妨げずに、過剰に蓄積した内臓脂肪や動脈硬化危険因子数を減らし、加速している動脈硬化の進行を遅くすることである。小児期MetSの多くは無症状であるが、思春期MetSではすでに2型糖尿病を発症してくる例もあり、この場合には薬物療法が必要となる。

小児期MetSの治療も小児肥満症に対する治療と同様に食事・運動療法である。そして治療を継続させるために行動修正療法的手法を取り入れる。

小児期MetSに対する魚食の有用性

様々な美味しい食べ物が満ち溢れた現代社会では、従来からのエネルギー制限を中心とした指導は遵守させるのが容易ではない。そこで、強いエネルギー制限は行わず、健康に良く、太りにくい食物を選択できる目を養うことを目的とした指導を行う。

食事で摂取される脂肪酸には、様々な種類があり、摂取する脂肪酸の種類によって、生体に及ぼす影響は異なる。牛脂やバターに含まれる飽和脂肪酸(SFA)は、血液中のLDLCを上昇させ、細胞膜表面に存在するToll like receptor-4:TLR-4に結合して、自然免疫系を賦活させ炎症性サイトカインの発生を促す⁴⁾。このため、生体内に慢性炎症状態が形成され動脈硬化が進行する。一方、オレイン酸に代表される一価不飽和脂肪酸は、血液中のLDLCを低下させ、反対にHDLCを上昇させて、抗動脈硬化作用を有する。オレイン酸は酸化されにくく、安全性が高い。多価不飽和脂肪酸(PUFA)は、二重結合の位置によってn-3系とn-6系に分けられる。EPAやDHAに代表されるn-3系PUFAはイワシやサマなどの青魚に多量に含まれており、血液中のLDLCを低下させHDLCを上昇させ

る。また、細胞膜を安定化させ、血栓形成を抑制する⁷⁾。植物の種子に多く含まれるn-6系PUFAも、血液中のLDLCを低下させHDLCを上昇させる。しかし、n-6系PUFAを過剰に摂取すると、細胞膜リン脂質中のアラキドン酸の割合が多くなり、細胞膜に存在する受容体にリガンドが結合した際に、アラキドン酸カスケードが優勢になり、炎症惹起作用や血小板凝集作用が非常に強い炎症性サイトカインの産生が相対的に多くなる。事実、n-6系PUFA過剰摂取はアトピー性皮膚炎を増悪させることが知られている⁸⁾。一方、n-3系PUFAを日常的に摂取すると、細胞膜リン脂質中のEPA濃度が上昇し、受容体にリガンドが結合した際に放出されるのは、EPA由来の炎症惹起作用が弱いエイコサノイドである。

炭水化物の選択法は、ジュースに代表される単純糖質は控え、主食にはできるだけグリセミクインデックスが低い食品を選択させることが大切である。具体的には、パン食よりはご飯、白米よりは玄米や雑穀米を選ぶようにする。

蛋白質の選び方は、獣肉を避け、魚や鶏肉、大豆製品を選ばせる。カツオやサバなどの赤身魚に多量に含まれる必須アミノ酸の一種であるヒスチジンは、水溶性で脳血管門を容易に通過する。ヒスチジンは脳内でヒスタミンに変わり、満腹中枢に作用して満腹感を生じさせ、エネルギー代謝を亢進させる⁹⁾。このように、赤身魚には肥満抑制効果がある。さらに、牡蠣や赤身魚の血合に存在するタウリンは、動物実験で高脂肪食によって誘導される肥満を抑制させる効

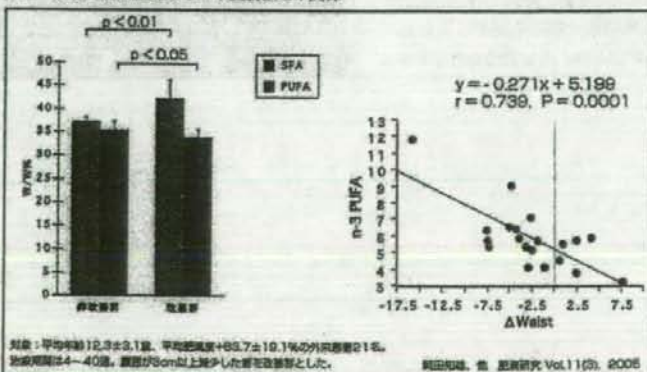
果があるばかりか¹⁰⁾、降圧作用や肝臓保護作用など多様な作用を有しており、健康で長寿な人の尿中タウリンは高値であることも知られている¹¹⁾。このように、魚食は、脂肪酸・アミノ酸の観点から、小児期MetS改善のための食事指導の中核をなす重要な要素の一つである。

図2に、肥満小児の外来治療効果と血中脂肪酸との関係を示す。外来治療によって腹囲が3cm以上減少した成功群は腹囲が3cm以上減少しなかった非成功群と比較して、治療前と治療後の比較で血中PUFAが上昇している。一方、非成功群は、治療前と比較して治療後のSFAが上昇している。また、治療前後の腹囲の減少率と血中n-3系PUFAとの間に負の相関が認められている¹²⁾。これらの結果は、魚食が小児肥満治療に有益であることを示唆している。

ファーストフードは、カロリーが高くSFAが多いため避けたほうが賢明である。特に、注意すべきは乳幼児期にファーストフードメニューに馴れさせないことが大切である。味覚にも刷込現象があり、世界各国の民族料理は、乳幼児期の刷込みによって次世代に伝承されてゆく。乳幼児期にファーストフードを日常的に与えることは、日本人としての食文化のアイデンティティ形成が阻まれる危険性が高い。

我々は、MetSの食事療法に和食や魚食を推奨している。外来における食事指導の際の標語として「さわかやグアイェット」を提唱している。さ:魚。わ:和食。や:野菜。か:海藻。グ:ダシ(大豆)。これは、日常的に選択すべき食品の頭

図2 小児肥満治療効果と血中脂肪酸との関係



対象: 平均年齢12.3±2.1歳、平均BMI値+85.7±19.1%の外来肥満21名。治療期間14~40週。腹囲が3cm以上減少した群を成功群とした。

岡山和食 肥満研究 Vol.11(2) 2005

文字を繋げたもので、子供にとって覚えやすいように、著者が考案したものである。

Life stage に応じた肥満予防

従来、小児肥満予防対策の多くは、幼児や学童を対象としてきた。しかし、近年、胎生期の低栄養と出生後の過栄養が、将来の肥満やMetS、高血圧、2型糖尿病の発症と関連があることが明らかになり、このような概念は、Developmental origins of health and disease: DOHaDと呼ばれている¹³⁾。若い女性の過剰な瘦身摂食、妊娠中の体重増加を戒める画一的な指導、小さく生んで大きく育てる育児法の推奨などの誤った価値観を是正することが、小児肥満や小児MetS予防対策として重要な意味を持つようになってきている。図3に、我が国が考えるLife stage に応じた小児肥満予防対策を示す。DOHaDの考え方によれば、MetS予防対策は一代限りではなく、世代を超えた問題として捉えられている点が重要である。

まとめ

2007年に厚生労働省の大岡班は小児期MetSの診断基準を策定した。MetSの病態は小児期から動脈硬化を進行させる。小児MetSに対する食事療法における魚食は、それに含まれるDHAやEPA、ヒスチジン、タウリンの生理作用を介して、血清脂質異常の改善、抗炎症作用、空腹感の抑制など、MetSに伴う健康障害を是正させるために有益な可能性が高い。魚、豆類、野菜、海藻、穀物を中心とした和食は、世界的に認められたHealthy foodである。我が国でも若年者ほど和食離れが進んでいるが、次世代を担う子ども

達の健康の維持・増進の為には、是非とも魚食・和食の習慣を伝えてゆきたいものである。

(参考文献)

- 1) メタボリックシンドローム診断基準検討委員会: メタボリックシンドロームの定義と診断基準 日本内科学会雑誌 2005; 94: 188-203.
- 2) 村田光昭: 子どもの肥満は増えているが 小児内科 2006; 38: 1528-1534.
- 3) 大岡武郎, 中川祐一, 中西俊樹, 他: 小児メタボリックシンドローム診断基準の各項目についての検討 厚生労働科学研究 小児期メタボリック症候群の概念・病態・診断基準の確立及び臨床的介入に関するコホート研究 平成18年度総合研究報告書 2007: 5-7.
- 4) 原 光彦, 齊藤恵美子, 岡田知雄, 他: 肥満小児における早期動脈硬化の評価について—頸動脈エコー法を用いて— 肥満研究 2006; 12: 25-30.
- 5) Iannuzzi A, Licenziati M, Acampora C, et al: Carotid artery stiffness in obese children with the metabolic syndrome. Am J Cardiol 2006; 97: 528-531.
- 6) Saska CG, Hollestelle MSc, Mergret R, et al: Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. Circulation 2004; 109: 393-398.
- 7) Penny M, Kris-Etherton, William S, et al.: Fish composition, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation 2002; 106: 2747-2757.
- 8) 島越新平: n-3系多価不飽和脂肪酸の治療への

応用と注意點 アトピー性皮膚炎 診断と治療社 東京 pp188-191, 2007.

- 9) 岡田祐一, 井川真紀子, 中島 浩: ヒスチジンと抗肥満 臨床栄養 2006; 109: 307-312.
- 10) Teuboyama-Kesaoka N, Shozawa C, Seno K, et al.: Taurine (2-Aminoethanesulfonic Acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. Endocrinology 2006; 147: 3276-3284.
- 11) Yemori Y, Liu L, Mizushima M, et al.: Male cardiovascular mortality and dietary markers in 25 population samples of 16 countries. J Hypertens 2006; 24: 1498-1505.
- 12) 岡田知雄, 黒森由紀, 原 光彦, 他: 小児における内臓脂肪指標の変化と長機多価不飽和脂肪酸との関係について 肥満研究 2005; 11: 43-49.
- 13) Gluckman PD, Hanson MA: Developmental origins of health and disease. Cambridge University Press, Cambridge, pp1-5, 2005.

(著者略歴)

- 原 光彦(はら みつひこ)
 80年 日本大学医学部大学院卒業
 日本大学付属板橋病院小児科
 97年 都立広尾病院勤務
 00年 小児科部長
 07年 東京都立広尾病院小児科部長

図3 肥満予防のための Life stage に応じた介入法

妊娠前	胎児期	乳児期	学童期	成人期
<p>胎前・産後期の生活習慣は、胎児期の健康状態に大きな影響を及ぼす。胎前・産後期の生活習慣を改善し、胎児期の健康状態を良くする。</p>	<p>乳児期の健康状態を良くする。乳児期の健康状態を良くする。乳児期の健康状態を良くする。</p>	<p>ファット・フリードを減らす。塩分・糖分を減らす。野菜・果物を多く摂る。魚・豆類、野菜、海藻、穀物を中心とした和食を摂る。身体活動を増やす。肥満予防プログラムを実施する。</p>	<p>ファット・フリードを減らす。塩分・糖分を減らす。野菜・果物を多く摂る。魚・豆類、野菜、海藻、穀物を中心とした和食を摂る。身体活動を増やす。肥満予防プログラムを実施する。</p>	<p>ファット・フリードを減らす。塩分・糖分を減らす。野菜・果物を多く摂る。魚・豆類、野菜、海藻、穀物を中心とした和食を摂る。身体活動を増やす。肥満予防プログラムを実施する。</p>

肥満小児に対する指導

原 光彦*

はじめに

わが国の肥満傾向児は1970～2000年までの30年間に約2～3倍に増加しており、最近では、増加傾向に歯止めがかかったかにみえるが、肥満度+50%以上の高度肥満小児の頻度は増加している¹⁾。肥満は小児期から、高血圧、糖代謝異常、血清脂質異常、肝障害、睡眠時無呼吸症候群などのさまざまな健康障害を引き起こし、とくにメタボリックシンドローム (Metabolic Syndrome: 以下MetSと略)の基本病態である内臓脂肪型肥満は、小児期から動脈硬化を加速させることから²⁾、小児期からの介入や治療が求められている。肥満小児に対する外来治療の基本は、肥満を惹起させた非健康的な生活習慣を見直し、蓄積した体脂肪を減少させ、肥満によって生じた健康障害を改善させることである。そして治療の際は、治療成績を向上させるため認知行動量法が併用される場合が多い。従来、肥満小児に対する治療や介入は食事療法に偏りがちであった。しかし、成長過程にある小児に厳しい食事制限を行うことは適切ではない。むしろ、多くの肥満小児で不足している身体活動量を増進させることが極めて大切である。この項では、一般外来で施行可能な、肥満小児に対する運動指導について解説したい。

肥満小児に対する運動の効用

運動は、エネルギー消費を促進させ、肥満者に認められる正のエネルギーバランスを是正させる。運動は骨格筋におけるインスリン感受性を高め、糖代謝異常を改善させるばかりか、血圧を降下させ、血管内皮機能障害を改善させて動脈硬化の進行を抑制する。小児の場合にも内臓脂肪型肥満は、脂肪細胞から分泌される生理活性物質であるアディポサイトカインのバランスの乱れを惹起させるが、肥満小児に対する運動療法は、このようなアディポサイトカインバランスの乱れを是正させる効果がある。また、運動は心肺機能を向上させ、除脂肪組織を維持して安静時基礎代謝を高めることで肥満しにくい体を作り、本来有している子どもらしい積極性を喚起させて、健全な自己像を確立することにも寄与する。さらに、子どもにとって体を動かすことは、それ自体が楽しみであり、運動にはストレス解消作用もある。また、走る・投げる・跳ぶなどの基本動作を習得する機会となり、その後の生涯スポーツ活動の基礎になる。また、習慣的な身体活動は記憶力を高めることも証明されている³⁾。

このように、子どもたちにとっての身体活動(運動)は、大人に対する身体活動の意義よりも広範で重要な意味を有している。運動する時間・場所・仲間の確保が難しい。現代のわが国の子どもたちの日常生活における身体活動は、ほとんど運動しない群と日常的にかなり運動している群の二

* 都立広尾病院小児科

表-1 生活習慣チェックリスト

チェックした日	/	/	/	/	/	/	/	総計	/	/	/	/	/	/	総計
早起きをする(:)															
朝ごはんを食べる															
給食の時おかわりしない															
夜食は食べない															
ジュースを飲まない															
おやつを守る															
体を動かす															
テレビやゲームは2時間以内															
家の手伝いをする															
早く寝る(:)															
合計															

寝る前に、1日の生活をふりかえりましょう。よい習慣は成功への近道です。都立広尾病院小児生活習慣病外来
各項目について、できたら○を、できなかったら×を付けさせて、次回受診日に持参してください。

極化が認められるが、肥満小児の大部分は運動不足である。脂肪は1kg当たり約7,000kcalのエネルギーがあり、運動で消費可能な熱量はごくわずかである。したがって運動療法だけで減量するには無理がある。しかし、肥満小児に対する治療戦略上、不足している身体活動量を必要なレベルまで上昇させることは、上述したようなさまざまな利点がある上、食事療法を強化する治療戦略よりも、患児やその保護者の理解や協力が得られやすいという利点がある。

身体活動を高めるための外来指導

肥満小児に対する身体活動に関する指導には、①座りがちな生活習慣を是正するための指導と、②積極的に運動させるための運動指導、の2つの方法に大別できる。

①は全ての対象児に行い、具体的方法はテレビやテレビゲーム、コンピュータに費やす時間を制限する。われわれは、2001年にアメリカ小児科協会が発表した「小児・若年者とテレビに関する勧告」⁴⁾を参考にして、テレビやビデオ、テレビゲーム・コンピュータに費やす時間を1日2時間

以内に制限し、子ども部屋にテレビやコンピュータを置かないように指導している。さらに、対象児に達成度を自己評価させるために、生活習慣改善のためのチェックリストを利用しているが、チェック項目の中に「テレビやテレビゲームは2時間以内」の項目を設けている(表-1)。また、アメリカのphysical activity pyramidを参考に、わが国の学習指導要領に適合するように工夫した教材である「運動富士山」を配布して、日常生活の中で対象児自身ができるだけ体を動かすように心がけるように勧めている(図-1)⁵⁾。

①の指導を行って、生活習慣が改善されてきたら、②の運動指導を行っていく。②を開始する際には、運動の効用について十分説明し、対象児の希望や嗜好性に合わせた目標設定をして、モチベーションを高める。そして、運動が禁忌となる基礎疾患や、肥満に伴う合併症の有無を確認するため、メディカルチェックを行う。それから、対象児の運動療法に対する準備性を評価し、現時点での有酸素運動能力を把握して対象児に合わせた指導ができるよう心がける。また、対象児の身体活動量や内容を把握するため、身体活動モニターを利用する。

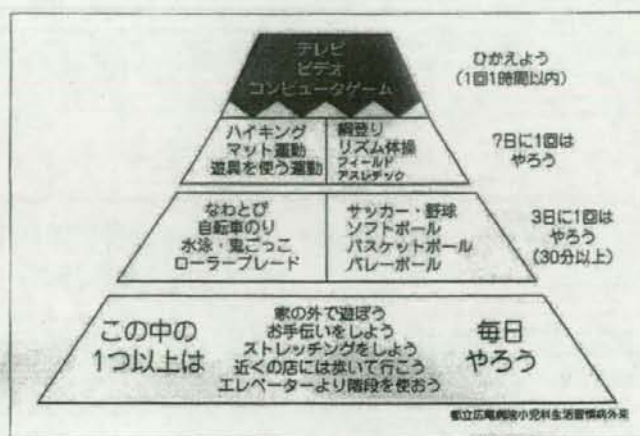


図-1 子どものための運動の目安

表-2 運動療法前に必要なメディカルチェック項目

- 問診
自覚症状の有無、既往歴、家族歴、運動歴を含む生活歴など
- 診察
身体計測(身長、体重、腹囲)、血圧測定、体脂肪率測定
肥満度、Body Mass Index、腹囲身長比の算出、成長曲線の作成
視診：黒色表皮症、皮膚皸癬、股擦れの有無
内科的診察(心雑音や不整脈、呼吸音の異常、肝腫大の有無、性成熟度)
整形外科的診察(骨、関節、筋肉の異常の有無)
- 胸部単純X線検査(立位正面像、側面像)
- 安静時12誘導心電図
- 血液検査
血液一般検査、生化学検査
AST、ALT、 γ GTP、LDH、CPK、BUN、Cr、尿酸、Na、K、Cl、
血糖、インスリン、HbA1c、総コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール
- 尿検査
糖、蛋白、ケトン体、微量アルブミン
- その他
心エコー検査、呼吸機能検査、腹部CT検査(腹部エコー検査)
運動負荷試験(トレッドミル負荷、自転車エルゴメータ)

肥満小児を扱う施設の中には、外来受診時に、指導者の監視下で特定の運動プログラムに参加させている施設もあるが、われわれの施設は急性期病院であり、肥満小児に対する運動療法を行う専

属スタッフや運動療法室を有していない。一般病院の外来や診療所で可能な指導法の一例として参考にさせていただければ幸いである。

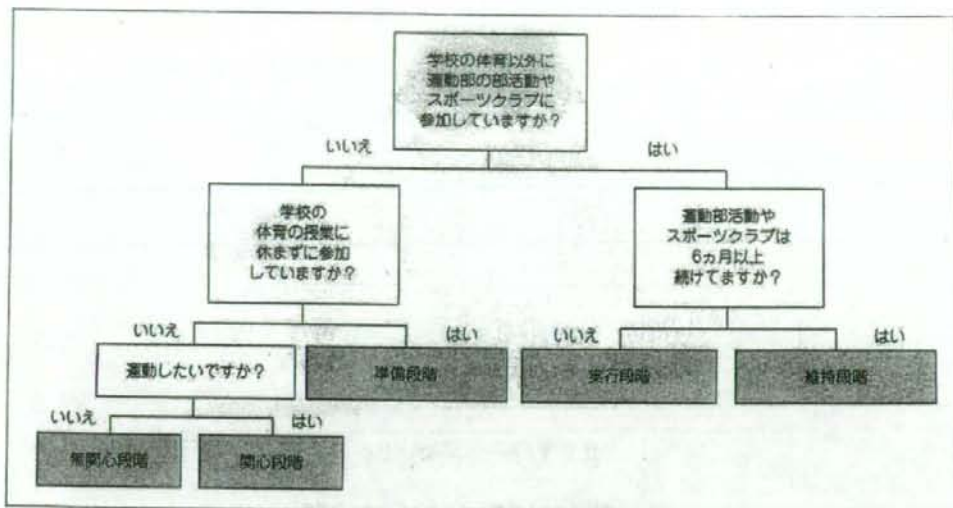


図-2 運動に対する準備性判定のためのフローチャート

●1. メディカルチェック

運動療法を行う前には、表-2に示したメディカルチェックを行う。とくに、詳細な問診は大切である。肥満小児の中には、心疾患、気管支喘息、てんかんや発達障害などの基礎疾患を有する者もあり、疾患や病状によって運動療法が禁忌となる場合もあるからである。

比較的良好に経過するのは、気管支喘息を合併した肥満小児である。肥満は気管支喘息の増悪因子の1つとして知られており⁶⁾、気管支喘息のコントロールが不良で運動誘発性喘息を生じる例では、喘息のコントロールを良好に保つことが先決である。

思春期の肥満小児の一部には、すでに2型糖尿病を発症し、血糖コントロールが悪く、尿ケトン体が強陽性の例もある。このような例では運動療法より、食事療法や薬物療法で血糖コントロールを改善させることが優先される。

肥満小児は正常体格者と比較して、股関節の異常や下肢のけがや故障が多い。大腿骨頭圧り症や、足関節の捻挫、踵骨の骨端炎などで腰部や下肢に強い疼痛がある場合は、運動療法よりもこれ

らの治療が優先される。

●2. 運動に対する準備状態の判定と準備状態に応じた指導法

運動療法を成功させるためには、対象とする児童や保護者が「運動」に対してどのように受け止めているか把握し、各対象児の準備状態に応じた指導を行う必要がある。図-2に示すフローチャートを利用すれば、簡単に運動に対する準備状態の判定ができる。具体的には次に挙げる3つの質問を行う。

- ①学校の体育以外のスポーツ活動の参加の有無と、参加している例では継続期間。
- ②体育の授業への参加状況。
- ③運動がしたいかどうか。

これらの質問の答えによって、対象児を「無関心段階」、「関心段階」、「準備段階」、「実行段階」、「維持段階」の5つの段階に分類する⁵⁾。

●a. 無関心段階

「無関心段階」にある小児に対しては、すぐに運動指導は行わず、日常生活を規則正しくすること、日常生活の中でできるだけ体を動かすことを

指導し、同時に肥満に伴う健康障害の種類や、これらを克服するとどのような利点があるかを説明し、太り過ぎている現実を自分の問題として受け止めることができるように支援する。

●b. 関心段階

「関心段階」にある場合は、学校の体育に参加できることを目標に指導を行う。

●c. 準備段階

「準備段階」の子どもの対しては、学校体育以外のスポーツ活動の参加を促し、対象児が興味を示すスポーツ種目について指導を受けることができるスポーツ教室や施設を、保護者とともにリサーチする。

●d. 実行段階

「実行段階」にある場合には、授業以外のスポーツ活動に参加した前後の各種肥満指標や血液検査データ、体力レベルの変化を示して、運動の効果を実感させ、運動を継続するためのモチベーションの向上を図る。

●e. 維持段階

「維持段階」にある子どもに対しては、運動習慣のない生活習慣に戻らないように支援する。とくに受験が近づくと、運動系の習い事を中止して、その時間を学習塾に充てるケースが多くなるが、ストレスが貯まりやすい受験勉強に時期には気分転換は大切であり、運動には記憶力や基礎体力の向上効果があるため、運動系の習い事を継続した方が結果はむしろよい場合が多いことを強調して、運動を継続できるよう支援する。

●3. 肥満小児の体力と有酸素運動能力の評価法

肥満小児の体力を肥満小児と比較すると、筋力は強いが、走る・跳ぶ・投げるなどスポーツに必要な基本的な能力や有酸素運動能力は劣っている場合が多い。一般的に、有酸素運動能力は、トレッドミルや自転車エルゴメータを用いて、対象児が疲労困憊（オールアウト）するまで漸増運動負荷を行い、同時に呼気ガス分析を行って、最大酸

素摂取量（ $\dot{V}O_2\max$ ）を測定することによって評価する。しかし、肥満小児に対してオールアウトするまで運動負荷をかけるのは難しく、検査に手間と時間がかかるため、外来診療の合間に行うのは現実的ではない。このため、主観的運動強度（PRE）や運動時の心拍数を用いる場合が多い。肥満小児に運動療法を行う場合には、PREで「楽である～ややきつい」、心拍数で120～140回/分程度の運動から開始するが、運動習慣のある生活を継続すると、有酸素運動能力の向上に応じて、同じ運動負荷に対するPRFや心拍数が低くなっていく。

●4. 肥満小児の身体活動量のモニタリング

外来における運動指導の際には、対象児の身体活動を把握する必要がある。対象児の身体活動の把握とフィードバックは、認知行動療法の中核となる重要なプロセスである。身体活動は「筋活動によって安静時よりエネルギー消費量の増大がもたらされる全ての営み」と定義され、運動とは「身体活動の一種であり、とくに体力を維持・増進させるために行う計画的・組織的で継続性のあるもの」と定義されている⁷⁾。一般に、運動の評価は比較的容易であるが、日常生活における運動以外の身体活動の評価は難しい。小児は遊びの中で体を動かすことが大部分であり、成人と比較して一定の運動を継続的に行うことが少ない⁸⁾。とくに、肥満小児は運動習慣に乏しく、多くの場合には日常生活における身体活動も少ないため、とくに評価が難しい。従来、問診や生活の記録を確認する方法が用いられてきたが客観性に乏しい。また、万歩計は歩行以外の身体活動の評価には適していない。このため、肥満小児の身体活動を把握する目的で、ライフコーダ[®]など次元速度計を用いた身体活動モニタリングが応用されている。ライフコーダ[®]は、垂直方向の加速度を検出可能な万歩計型の身体活動モニターである。歩数以外に4秒ごとの運動強度を11段階で評価が可能であり、専用の解析ソフトを用いることによって、曜日別の身体活動状況や1日の身体活動状況のトレンドグラフを対象児やその保護者に呈示することができる。トレンドグラフは、身体活動以

外にも、起床時刻や就寝時刻などの生活リズムも評価できるため非常に有益である。何故なら、学校の体育に参加しておらず、運動もしたくない「無関心段階」の肥満小児は、生活リズムに乱れが生じている場合が多く、生活指導や運動指導が奏効すると、生活リズムも正常化していく例が多いからである。

最近、Active style Pro[®]などの三次元加速度計が開発されている。低強度の身体活動は、垂直方向より水平方向の加速度の関与が大きいといわれており⁹⁾、肥満小児の身体活動評価の際は、一次元加速度計より三次元加速度計の方がより正確に評価できる可能性がある。

●5. スポーツ系の習い事の勧め

現代の社会環境は少子化が進行し、学力至上主義が今なお幅をきかせ、学習塾は隆盛を極めている。また、室内で個人で遊ぶことが一般的になるなど、子どもたちの遊び方にも変化が認められている。したがって、昔は当たり前だった、子どもたちが自然発生的に屋外で体を動かして遊ぶという状況は期待しにくい。肥満外来では、対象児の身体活動を増やすため、さまざまな指導を行っているが、対象児の年齢層によって指導内容や指導法を変える必要がある。

対象児が幼児や小学生低学年で肥満の程度も中等度以下の場合には、保護者に、可能な限り子どもと一緒に屋外で遊ぶ機会を作るように指導して、対象児に体を動かす楽しみを体験させることで、身体活動量が増加することが多い。しかし、小学校の中学年(3~4年生)以降になると、保護者とともに体を動かすことを嫌うケースも多くなる。これらの年齢層に対しては、リトルリーグやスポーツ少年団、ジュニアサッカー、水泳教室など、対象児が好む種目の団体に所属させ、定期的に運動する機会を確保する方法が現実的である。われわれが東京都内の小学生を対象として行った調査では、学校の体育以外に、2回/週以上運動系のスポーツ活動を行っている子どもたちは、そうでない子どもたちより肥満は明らかに少なく、糖代謝指標や脂質代謝指標も良好で、小児期MetSやMetS予備群は皆無であった¹⁰⁾。また、

外来経過中に肥満が著明に改善(高度肥満が軽度肥満以下に改善)した例は、全例がなんらかのスポーツ系習い事を継続したケースであった。

最近、体育の家庭教師や、パーソナルトレーナーなどのサービスも利用可能になってきている¹¹⁾。子どもの肥満改善は、家族ぐるみで取り組むことが基本であるが、共働きなどで、どうしても子どもと一緒に遊ぶ機会を作ることができない場合や、肥満が高度で、すぐにはスポーツ系の習い事に参加できない例などには有効であり、経済的余裕があれば、これらのサービスを利用することを勧めるのも1つの方法である。

●6. 肥満小児の運動療法の際に留意すべき点

肥満小児の運動特性として、膝の屈伸動作が不十分であること、身体をねじる動作が稚拙であること、股擦れが生じやすいこと、集中力や忍耐力が乏しいこと、転倒しやすいことが挙げられる¹²⁾。したがって、運動療法中は転倒や子ども同士の衝突が十分に起こりうることを認識し、けがや故障の予防に留意する。また、運動療法は徐々に行い、様子をみながら徐々にステップアップする。

小児は、成人と比較して細胞外液が多く、腎臓の濃縮能が未熟で、水の代謝回転が遅いため、運動中に脱水症を生じやすい。したがって、運動療法中は十分な水分補給が必要である。しかし、糖分を含むスポーツ飲料を多飲すれば、当然のごとく運動による減量効果は相殺されてしまうため、糖分を含まない飲料を選択させるように指導する。

まとめ

肥満は、小児期から動脈硬化を加速させ、心血管病や2型糖尿病などの生活習慣病を引き起こす。最近の研究によって、小児や若年者に対する運動療法は、たとえ肥満指標や血清脂質、糖代謝指標に変化が生じないレベルでも、血管内皮機能には好影響を及ぼすことが明らかになり、運動による血流の増加に伴うShear Stressの増加が直接的に血管内皮機能改善させる可能性が示唆され

ている¹³⁾。

適切な身体活動は、健全な成長発達や健康の維持・増進に不可欠である。われわれ医療従事者は、身体活動が健康に及ぼすさまざまな好影響について折に触れて啓蒙しなければならない。そして、現代社会が目指している、豊かで便利で体を動かす必要も乏しいし、体を動かすことを軽視する社会が、本当に幸せをもたらすか再考する必要がある。そして、次世代を担う子どもたちに、生活習慣病発症による“Premature death”という悲劇を生じさせないためには、文明国家として、子どもたちに対して、週に2回程度、楽しんで体を動かす時間を与えられる程度の余裕があつてしかるべきであろう。

文 献

- 1) 村田光範：子どもの肥満は増えているか。小児内科 38：1528-1534, 2006。
- 2) 原 光彦ら：肥満症における早期動脈硬化の評価について—総頸動脈エコー法を用いて—。肥満研究 12：25-30, 2006。
- 3) 原 光彦, 伊東三吾：子どもの身体活動の必要性—子どもに動脈硬化が起こっている—。日本臨床スポーツ医学会雑誌, 投稿中, 2008。
- 4) American academy of pediatrics Committee on public education：Children, Adolescents, and Television. Pediatrics 107(2)：423-426, 2001。
- 5) 原 光彦：運動療法のすすめ方。日本肥満学会

報 小児の肥満症マニュアル 第1版 第3刷：64-74, 2008。

- 6) National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute：GINA 2002(日本語版)(牧野莊平, 太田 健監修)。協和企画, 東京, 117-123, 2002。
- 7) Caspersen, C. J. et al.：Physical activity, exercise, and physical fitness：definitions as distinctions for health-related research. Public Health Rep. 100：126-131, 1985。
- 8) 田中千晶ら：一軸加速時計を用いた幼児の身体活動量の評価精度。体力科学 56：489-500, 2007。
- 9) Tanaka, C. et al.：Triaxial accelerometry for assessment of physical activity in young children. Obesity 15：1233-1241, 2007。
- 10) 伊藤祐佳ら：小児期メタボリックシンドロームと生活習慣。第15回小児BI法研究会抄録集 9, 2008。
- 11) 富樫健二ら：小児期メタボリックシンドローム・肥満症に対する運動療法。Adiposience 4：421-427, 2007。
- 12) 羽崎泰男：運動療法の進め方。よくわかる子どもの肥満(岡田知雄編)。永井書店, 大阪, 86-92, 2008。
- 13) Kelly, A. S. et al.：Inflammation, insulin, and endothelial function in overweight children and adolescents：the role of exercise. J. Pediatr. 145(6)：731-736, 2004。

好評
発売中!

アスレチックトレーナーのためのスポーツ医学

編集●宮永 豊(筑波大学教授)・河野一郎(筑波大学教授)・白木 仁(筑波大学講師)

◆日本体育協会によるアスレチックトレーナーの資格制度発足を踏まえ、競技現場で必要となるスポーツ医学に関するすべての事項を網羅した実践書。スポーツ医学の知識が体系的に整理されており、体育教師やコーチ、スポーツ医にも役立つ内容。

●B5判・484頁/定価5,040円(本体4,800円+税5%) ISBN978-4-8306-5129-8

①文光堂

<http://www.bunkodo.co.jp> 〒113-0033 東京都文京区本郷7-2-7 tel:03-3813-5478/fax:03-3813-7241

研 究 臨 床

第80回学術講演会

小児期メタボリックシンドロームの診断と治療

都立広尾病院小児科部長 原 光彦

【はじめに】

我が国では、総死亡に占める動脈硬化性疾患が約3割を占めている。内臓脂肪型肥満に血清脂質異常、血圧高値、空腹時高血糖の内、複数の動脈硬化危険因子が集積した病態であるメタボリックシンドローム (Metabolic Syndrome: 以下MetSと略) は、強力に動脈硬化を促進させる。我が国では本年4月から40歳以上の成人を対象として、動脈硬化性疾患発症予防を目的として特定健診・特定保健指導 (通称メタボ健診) が開始された。しかし、MetSの病態は小児にも存在し、動脈硬化は小児期から既に始まっている¹⁾。我が国の若年成人の急性心筋梗塞患者におけるMetSの関与を検討した研究によれば、より若年で発症した群ほどMetSの関与が大きく、30歳台で急性心筋梗塞を発症した者は全例MetSであったという報告もある²⁾。このような、悲惨な例をなくすためには、動脈硬化性疾患に対する予防対策は小児期から行われなければならない。そして、動脈硬化性疾患予防対策を進める上で、主要な対象となるのが、MetS小児である。今回は、厚生労働科学研究班 (大関班) が作成した小児期MetSの診断基準を紹介するとともに、小児期MetSに対する治療法について解説したい。

【成人及び小児期MetSの診断基準】

成人MetSの診断基準には様々な種類がある。MetS診断の臨床的帰着を何に設定するかによって、2型糖尿病発症予防を目的としたWHOの診断基準³⁾、心血管病を予防とした米国のNational Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III)の診断基準⁴⁾、我が国の8学会合同委員会基準⁵⁾、国際糖尿病連盟(International Diabetes Federation: IDF)の基準⁶⁾ などがある。心血管病予防を目的とした3種類の診断基準を比較すると、腹部肥満を必須とするか否か、血清脂質異常において高TG血症と低HDL血症を独立して扱うか否かで微妙に異なっている (表1)。脂肪細胞研究で世界をリードし、過剰な内臓脂肪蓄積がMetSの源流と考える研究者が多い我が国で作成した8学会合同委員会基準では、腹部肥満を必須項目としているのに対し、国際的には腹部肥満を必須としないNCEP ATP IIIの診断基準が最もよく用いられている。

2005年の8学会合同委員会による日本人成人を対象としたMetS診断基準の発表を受けて、同年から、厚生労働科学研究費補助金を受けて、「小児期メタボリック症候群の概念・病態・診断基準