

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15485

研究課題名(和文) ヒト褐色脂肪組織に特異的な血中エクソソームmiRNAの探索と評価法への活用

研究課題名(英文) Exosomal miRNA as a marker of brown adipose tissue in humans

研究代表者

斉藤 昌之 (SAITO, MASAYUKI)

北海道大学・獣医学研究科・名誉教授

研究者番号：80036441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥満のターゲットの一つであるヒト褐色脂肪の簡便・低侵襲な評価法を開発する為に、成人血中のエクソソームmiRNAを網羅的に分析・定量し、標準法であるFDG-PET/CTで測定した褐色脂肪活性と比較した。

健康男性40名から得た血清サンプルから得たエクソソームmiRNAを網羅的アレイ解析した所、高活性者と低活性者で1.5倍以上異なる可能性のあるmiRNAが11種選抜されたので、更にPCR法で定量したところ、miRNA122-5p濃度が高活性者では低活性者に比べて有意に低値であることが判明した。

血中エクソソームmiRNA122-5pが褐色脂肪活性を反映するマーカーとなりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue (BAT) is a site specific for non-shivering thermogenesis during cold exposure and food intake, contributing to the autonomic regulation of expenditure and body fat content. To develop a simple and noninvasive method of assessing BAT in humans, serum exosomal miRNA was analyzed with special reference to the BAT activity assessed by the standard FDG-PET/CT method, which has serious limitations including the enormous cost and radiation exposure. An extensive array and PCR analyses of serum sample obtained from 40 healthy volunteer subjects revealed that the concentration of 11 miRNA species, particularly that of miRNA122-5p, was significantly lower in subjects with higher BAT activities. These results suggest that serum miRNA122-5p may be a quantitative index of BAT activity in humans.

研究分野：栄養代謝学

キーワード：褐色脂肪組織 血中マーカー miRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪組織（以下褐色脂肪）は脂肪酸を酸化し熱へと転換する特殊な組織である。我々は、がんの画像診断に汎用されている FDG-PET/CT を応用して成人にも褐色脂肪が存在することを世界に先駆けて見出し、これがエネルギー消費の調節に関わり機能低下が肥満の一因になることを明らかにしてきた (Yoneshiro T & Saito M: Ann Med 2015, 47:133-141, Kajimura S & Saito M: Annu Rev Physiol 2014, 76:225-249)。それ以来、肥満や関連代謝疾患対策のターゲットとしての褐色脂肪に対する関心が急速に高まり、国内外を通じて活発に研究が行われている。現在、我々が確立した FDG-PET/CT 法が標準法となっているが、本法は装置が大掛かりで検査費用も高額であるのみならず放射線被曝を伴うので、その利用は大幅に制約を受け研究展開のボトルネックになっている。従って、簡便かつ侵襲の少ない評価法が開発されれば、基礎並びに臨床研究が一挙に加速・進展すると思われる。

最近、細胞が分泌する小胞エクソソーム、特にそれに含まれている様々なタンパク質や核酸の分析や役割が明らかにされつつある。特にがん細胞由来のエクソソーム中の微小 RNA (miRNA) の血中分析がガン診断に有効であるとして注目されている (Vader P et al: Trend Mol Med 2014, 20:387-393)。ヒト脂肪組織からもエクソソーム miRNA が分泌されていることが知られているが、褐色脂肪由来のエクソソームや血中動態などについての情報は皆無である。

2. 研究の目的

成人血中のエクソソーム miRNA を網羅的に分析・定量し、FDG-PET/CT で評価した褐色脂肪と相関する特異的 miRNA を同定する。選抜された候補 miRNA の簡便な測定法を開発しながら褐色脂肪を評価する血中マーカーとしての有用性を確立する。

3. 研究の方法

(1) FDG-PET/CT 測定

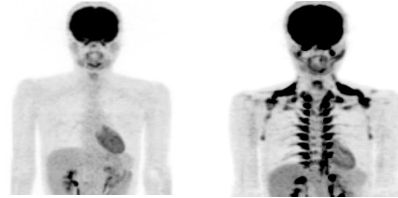
健常被験者をリクルートし、以下のとおり褐色脂肪活性を FDG-PET/CT 検査により測定した。

被験者は 6 時間以上絶食して、検査施設 (LSI 札幌クリニック、札幌市) にて一般的な問診を受けてから、体組成計 (オムロン) による体重、体組成などの測定、静脈血の採取を受けた。血液サンプルから分離した血清は -30 で保存した。

その後、検査用ガウンに着替えて寒冷暴露 (19 の部屋にて上半身裸、布で包んだ氷ブロックの上に両足を乗せる) を受けた。1 時間後に ^{18}F -FDG を投与され、同様の寒冷暴露を計測して受けた。1 時間後に 24 で PET/CT 全身スキャン (Toshiba Medical Systems) を受けた。PET と CT 画像を VOX-BASE ワークステーション (J-MAC System) にて解析し、褐色脂肪に相当する鎖骨上肢脂肪組織への FDG 集積を肉眼的に観察するとともに SUVmax 値として定量化し、高活性者と低活性者に群分けした (図 1)

(表 1 被験者プロフィール)。

図 1 FDG-PET/CT による褐色脂肪の検出・評価
低活性者 (左) と高活性者 (右)



(2) エクソソーム miRNA の抽出と定量

血清からのエクソソームの抽出には Total exosome isolation kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。エクソソームサンプルにスパイクインコントロールとして cel-miR-39-3p Spike-in (QIAGEN) を加えた後に、miRNA easy kit (QIAGEN) を用いて miRNA を抽出した。一部のサンプルはアレイ解析 (Agilent Technologies, SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイ) に用いた。

抽出した miRNA を Mir-X miRNA first strand synthesis kit (Clontech) により逆転写した後、FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics) および Light Cycler system (Roch Diagnostics) を使用して real-time PCR により定量した。miRNA の発現量はスパイクインコントロールとして加えた cel-miR-39-3p の発現量で補正し、

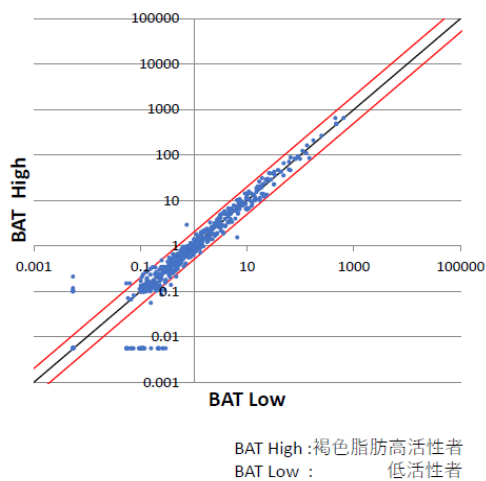
褐色脂肪活性との関係について統計的解析により検討した。

4. 研究成果

(1) アレイ解析

研究代表者がすでにFDG-PET/CT法で褐色脂肪活性を評価した健常男性8名（高活性者4名、低活性者4名）から得た血清サンプルからエクソソームを調製しmiRNAを抽出して網羅的アレイ解析を行った結果、濃度が一定レベル以上でかつ高活性者と低活性者で1.5倍以上差のあるmiRNAが11種（7a, 92a, 451, 122-5p, 125b, 557, 3148, 885, 6776, 7109, 4673）選抜された（図2）。

図2 マイクロアレイによる血中エクソソームmiRNA濃度の比較



(2) PCR解析

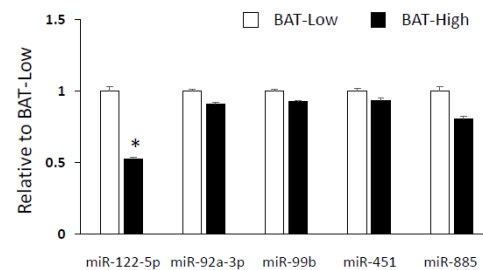
アレイ解析により候補となったmiRNAについて総数40名の被験者（高活性者20名、低活性者20名）から得られた血清サンプルを用いてエクソソームmiRNAをPCR法で定量した。高活性者と低活性者の間で褐色脂肪活性（BAT(SUVmax)）は有意に異なるが、年齢、体重、BMIや血中代謝パラメータに違いはなかった（表1）。上記11種のmiRNAのうち4種について低活性者に比べて高活性者で低い傾向が認められたが、有意な差には至らなかった。miRNA122-5p濃度は低活性者に比べて高活性者で有意に低値となることが判明した（図3）。

表1 被験者のプロフィール

| | All subjects (n=40) | High BAT (n=20) | Low BAT (n=20) | t-test (2-tail) High vs. Low |
|--|---------------------|-----------------|----------------|------------------------------|
| Age (years) | 22.3 ± 2.3 | 21.9 ± 1.9 | 22.8 ± 2.7 | 0.26 |
| Weight (kg) | 61.5 ± 8.7 | 59.6 ± 6.7 | 63.4 ± 10.1 | 0.17 |
| BAT (SUV) | 6.2 ± 6.5 | 11.0 ± 6.0 | 1.4 ± 0.8 | < 0.001 |
| BMI (kg m ⁻²) | 21.0 ± 2.7 | 20.5 ± 1.8 | 21.5 ± 3.4 | 0.26 |
| Body fat mass (kg) | 9.9 ± 4.0 | 9.0 ± 3.0 | 10.8 ± 4.7 | 0.17 |
| HDL-cholesterol (mg dl ⁻¹) | 62.4 ± 13.6 | 65.0 ± 15.1 | 59.8 ± 11.8 | 0.23 |
| Triglycerides (mg/dl ⁻¹) | 75.7 ± 46.4 | 67.5 ± 35.8 | 84.0 ± 54.8 | 0.26 |
| Glucose (mg dl ⁻¹) | 79.7 ± 5.1 | 81.0 ± 6.1 | 78.5 ± 3.5 | 0.12 |
| Insulin (mU l ⁻¹) | 4.9 ± 3.0 | 4.9 ± 2.5 | 5.0 ± 3.5 | 0.89 |

Mean ± SD

図3 褐色脂肪高活性者(BAT-High)と低活性者(BAT-Low)における血中エクソソームmiRNA濃度



(3) 多変量解析

多変量解析の結果、miRNA122-5p濃度と褐色脂肪活性の関係は年齢や肥満度などとは独立であることが確認された（表2）。

表2 回帰分析による褐色脂肪活性に影響する因子の検討

| | Univariate Odds Ratio (95% CI), p value | | Multivariate Odds Ratio (95% CI), p value | | |
|-----------------|---|--------|---|-----------------|--------|
| | R | P | β | Standardize d β | P |
| BAT (SUV) | | | | | |
| miR-122-5p | 0.360 | 0.023* | -6.08 | -0.537 | 0.028* |
| Age | 0.042 | 0.796 | 0.663 | 0.241 | 0.266 |
| BMI | 0.181 | 0.265 | -0.195 | -0.082 | 0.800 |
| Body fat mass | 0.196 | 0.225 | -0.143 | -0.089 | 0.861 |
| HDL-cholesterol | 0.179 | 0.269 | 0.038 | 0.081 | 0.680 |
| Triglycerides | 0.099 | 0.543 | 0.022 | 0.157 | 0.471 |
| Insulin | 0.105 | 0.520 | 0.581 | 0.273 | 0.164 |

(4) 寒冷暴露の影響

これらの結果は2時間の寒冷暴露後に採取した血清サンプルでも同様であった。

これらの結果から、血中エクソソーム miRNA122-5p がヒト褐色脂肪活性を反映するマーカーとなりうると結論した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Nagaya K, Okamatsu-Ogura Y, Nio-Kobayashi J, Nakagiri S, Tsubota A, Kimura K. [Effect of ambient temperature on the proliferation of brown adipocyte progenitors and endothelial cells during postnatal BAT development in Syrian hamsters.](#) J Physiol Sci, 査読有, 2018, in press. doi: 10.1007/s12576-018-0606-8.

Machida K, Okamatsu-Ogura Y, Shin W, Matsuoka S, Tsubota A, Kimura K. [Role of macrophages in depot-dependent browning of white adipose tissue.](#) J Physiol Sci, 査読有, 2018, in press. doi:10.1007/s12576-017-0567-3.

Okamatsu-Ogura Y, Nio-Kobayashi J, Nagaya K, Tsubota A, Kimura K. [Brown adipocytes postnatally arise through both differentiation from progenitors and conversion from white adipocytes in Syrian hamster.](#) J Appl Physiol, 査読有, 124, 2018, 99-108. doi:10.1152/jappphysiol.00622.2017.

Okamatsu-Ogura Y, Fukano K, Tsubota A, Nio-Koyayashi J, Nakamura K, Morimatsu M, Sakaue H, Saito M, Kimura K. [Cell-cycle arrest in mature adipocytes impairs BAT development but not WAT browning, and reduces adaptive thermogenesis in mice.](#) Sci Rep 査読有, 7, 2017, 6648-6659. doi:10.1038/s41598-017-07206-8.

Uchida K, Dezaki K, Yoneshiro T, Watanabe T, Yamazaki J, Saito M, Yada T, Tominaga M, Iwasaki Y. [Involvement of thermosensitive TRP channels in energy metabolism.](#) J Physiol Sci 査読有, 67, 2017, 549-450. doi:10.1007/s12576-017-0552-x.

Yoneshiro T, Matsushita M, Hibi M, Tone

H, Takeshita M, Yasunaga K, Katsuragi Y, Kameya T, Sugie H, Saito M. [Tea catechin and caffeine activate brown adipose tissue and increase cold-induced thermogenic capacity in humans.](#) Am J Clin Nutr 査読有, 105, 2017, 873-881.

doi:10.3945/ajcn.116.144972.

Shin W, Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Kimura K.

[Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice.](#)

Obesity, 査読有, 25, 2017, 417-423.

doi:10.1002/oby.21727.

斉藤昌之、褐色脂肪組織の全身代謝効果と介在因子、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無 44, 2017, 432-437.

[学会発表](計4件)

斉藤昌之、褐色脂肪組織とエネルギー代謝・肥満(教育講演) 第38回日本肥満学会、2017年10月、大阪市

Matsushita M, Hibi M, Oishi S, Yoneshiro T, Yamaguchi T, Usui C, Yasunaga K, Katsuragi Y, Kubota K, Tanaka S, Saito M. Diurnal variation of postprandial thermogenesis and substrate oxidation in humans: Involvement of brown adipose tissue. RACMEM 2017, Oct 2017, Fribourg, Switzerland

Saito M. Brown adipose tissue as a therapeutic target for human obesity. (招待講演)2017 International Conference on Diabetes and Metabolism, Sep 2017, Seoul, Korea

斉藤昌之、松下真美、日比壮信、大石幸子、田中茂穂、食後の代謝・熱産生応答の日内変動と褐色脂肪組織の関与、第4回時間栄養科学研究会、2017年8月、名古屋市

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 昌之 (SAITO, Masayuki)
北海道大学・大学院獣医学研究科・名誉教授
研究者番号：80036441

(2) 研究分担者

松下 真美 (MATSUSHITA, Mami)
天使大学・看護栄養学部・講師
研究者番号：60517316

岡松 優子 (OKAMATSU, Yuko)
北海道大学・大学院獣医学研究院・講師
研究者番号：90527178

