

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01772

研究課題名(和文) 運動によるHDL代謝・機能の向上作用とミトコンドリア機能へおよびす効果の検討

研究課題名(英文) Beneficial effects of aerobic exercise on HDL metabolism and cellular mitochondria function by an improvement of HDL function.

研究代表者

上原 吉就 (UEHARA, Yoshinari)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：70373149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、抗動脈硬化治療戦略として高比重リポ蛋白(HDL)を標的とした治療戦略が注目されている。しかしながら、HDLコレステロール(HDL-C)上昇を目的とした治療薬は未だ臨床応用されておらず、運動がHDL-C増加効果を期待出来る現実的な治療法である。

本研究では低HDL-Cあるいはメタボリックシンドローム患者において、乳酸域値運動によるHDL-Cの増加作用を明確にした。また、HDLならびに人工HDLを用いることによって、耐糖能の改善作用ならびに筋ミトコンドリア機能の向上作用を示し、運動によるHDL-C上昇とインスリン抵抗性改善および骨格筋機能向上作用との関連メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDL コレステロール(HDL-C)は“善玉コレステロール”と呼ばれ、高いほど動脈硬化リスクが低下し治療ターゲットとして注目されているが、HDL上昇薬は未だ臨床応用されていない。運動によるHDL-C上昇作用は相反する報告が散見される。本研究では、低HDL-Cおよびメタボリックシンドローム患者を対象として、最も脂質利用が多い乳酸閾値強度運動によるHDL-C上昇効果を明らかにした。また、2型糖尿病をはじめとしてインスリン抵抗性の病態ではHDL-Cが低下することが広く信じられているが、本研究の結果からは、骨格筋を介してHDL-C低値が逆にインスリン抵抗性を引き起こしている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Recently, high-density lipoprotein (HDL)-targeting therapy is drawing attention as an anti-atherosclerotic therapeutic strategy. However, a therapeutic drug for the purpose of raising HDL cholesterol has not been clinically applied yet, and exercise is a realistic treatment method that can be expected to have an effect of increasing HDL cholesterol.

This study clarified the increasing HDL cholesterol level by lactate threshold level exercise in patients with low-HDL cholesterol or metabolic syndrome. In addition, as a result of examining the effect of progressing mitochondrial function in skeletal muscles and improving glucose tolerance using HDL and its mimetics, it was revealed that there is a relationship between HDL cholesterol elevation by exercise and insulin resistance improvement or muscle function progressing effect.

研究分野：スポーツ内科学

キーワード：HDL ミトコンドリア 骨格筋 有酸素運動 乳酸域値 リポ蛋白 耐糖能異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において高血圧、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病に対する国民医療費は年間 10 兆円近くを占めているにもかかわらず、動脈硬化性疾患の代表である心疾患は依然として増加傾向であり日本人死因の 15.5% を占め、日本人死因は全悪性新生物に次いで第 2 位となっている。心筋梗塞が含まれる虚血性心疾患に対する医療費は、年間 7,000 億円以上と最近の治療進歩のおかげでその死亡率こそやや上げ止まり傾向であるが、罹患率は増加の一途を辿っている。生活習慣病の低年齢化や耐糖能異常・肥満の増加は、将来の虚血性心疾患に対する医療費高騰を容易に推察でき、また心筋梗塞後に心不全発症することによる医療費の増加も問題となっている。コレステロール高値が心血管疾患のリスクを増加させることは周知の事実であるが、高比重リポ蛋白コレステロール(HDL) の低値もまた、LDL コレステロールの高値以上に心血管疾患のリスクを増加させることが多くの大規模疫学研究・臨床試験によって明らかにされている。これまでの多くの研究から HDL コレステロールの虚血性心疾患への影響は、HDL が 1.2 mg/dl 増加するごとに虚血性心疾患のリスクは少なくとも 3% 減少することが明らかにされている。このことは HDL を 12 mg/dl 増加することが可能であれば、単純計算では少なくとも心血管疾患リスクを約 30%抑制できることから、心血管疾患に対してのみでも現在の医療費ベースで年間約 2,200 億円の削減が可能であると試算される。このことから抗動脈硬化治療としてこの HDL を標的とした治療戦略がグローバルに注目されているが、HDL のみを標的とした治療薬は未だ臨床応用できていない。HDL のコレステロール量を上昇させる新規薬剤として、コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 阻害薬の臨床試験が試みられているが、トルセトラピブの臨床試験の結果 (Barter-PJ. *N Engl J Med* 2007; 357: 2109-22) から心血管イベントの増加が認められた。その後の Dalcetrapib、Evacetrapib のいずれの薬剤も HDL コレステロール値を顕著に増加するにも拘わらず心血管病リスクの軽減効果は認められず (Schwartz GG *N Engl J Med*. 2012;367:2089-99)、その HDL の質が疑問視されている。一方、HDL 標的治療として最近、人工 HDL が注目されている。私達はこれまでに、合成ペプチドを用いた人工 HDL の開発を進めてきた (FAMP ペプチド; 特許第 5742029)。この人工 HDL は HDL 粒子中のコレステロール量を上昇させることはないが、HDL によるコレステロール引抜き能や抗炎症効果などの HDL 機能を増加させマウスの動脈硬化を抑制することが明らかになり、現在臨床応用への準備中である。これら HDL 標的薬による結果は、HDL のコレステロール量を増加させることよりも HDL の持つ機能を増強させた結果として、HDL のコレステロール量が増加することが心血管病治療に重要である可能性が示唆される。現在の所、HDL コレステロール増加作用が最も期待できる現実的な治療法の 1 つとしては、有酸素系運動による上昇効果である。これまでの我々の報告では運動の効果では、HDL コレステロールが 4~9mg/dl 程度上昇 (Koba et al. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(10): 833-45, Michishita et al. *J Metabolic Syndr*. 2014; 3(3): 1000150) するが、一方で海外の報告では運動による HDL コレステロール上昇作用は認めていない報告も散見されることから、この相反した結果からもその詳細は未だ明らかにされていない。この HDL への作用の相違は運動負荷量に依存しているとの仮説を基に HDL 代謝への影響ならびに HDL 機能への改善作用を解明する必要がある。また、さらに Lehti らは HDL による骨格筋ミトコンドリア機能の上昇作用を明らかにしていることから (Lehti et al. *Circulation*. 2013; 128: 2364-2371.)、運動による HDL のコレステロール上昇およびその機能改善が骨格筋ミトコンドリア機能の向上に寄与しているのかも併せて明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

抗動脈硬化治療戦略として、これまで一貫して HDL を標的とした脂質輸送体や転写因子ならびに人工 HDL に関連する研究を行い、エビデンスを構築してきた。しかしながら、HDL のみを標的とした治療薬は未だ臨床応用はされておらず、有酸素系運動による HDL コレステロール増加効果が最も現実的かつ効果的な治療法の 1 つである。本研究では、運動による HDL コレステロールの増加作用を明確にするとともに、運動が HDL コレステロールの量への作用のみでなく、その代謝関連分子や HDL の機能改善を介した効果ならびに HDL の骨格筋ミトコンドリア機能向上作用および HDL 自身のインスリン抵抗性や骨格筋への作用メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) エルゴメーターにより乳酸域値強度および呼気ガス分析装置を用いた嫌気性代謝閾値強度の運動介入前後において、体重、体組成、脂質、血糖、各種動脈硬化関連マーカーを測定、また HDL コレステロール値におよぼす影響を検討する。

運動介入試験: メタボリックシンドローム患者、低 HDL コレステロール患者を対象として、エルゴメータを使用した運動を 60 分/日、週 1 回および週 3 回の運動介入を 12 週間行う。対照群として介入無し (コントロール) 群、食事制限群を設定した。

運動強度は、乳酸域値強度運動 (Michishita.R et al. *J Metabolic Syndr*, 2014; 3) を 60 分/日、週 1 回~週 3 回の運動介入を 12 週間施行した。

(2) HDL の直接的な耐糖能改善効果を動物モデルで解明する。HDL の機能を顕著に改善する独自に開発した人工 HDL である FAMP ペプチド (Uehara.Y et al. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2:

e000048) を用いることにより、運動させることなくマウスにおいて HDL の直接的な耐糖能改善効果を解明する。インスリン抵抗性モデルマウスとして、C57BL6J マウスへの 6 週間の高脂肪食負荷と同時に人工 HDL の 1 つである FAMP (50mg/kg B.W) を腹腔内投与を行い、HDL 機能への効果を確認後、glucose tolerance test (ipGTT) および insulin tolerance test (ipITT) によるインスリン抵抗性評価に対する FAMP のインスリン抵抗性の改善効果を評価する。

(3) ヒト血漿由来 HDL ならびに人工 HDL の骨格筋細胞のミトコンドリア機能向上作用を明らかにする。さらに人工 HDL で pre-treatment したヒト HDL 分子の骨格筋ミトコンドリア機能への作用を検討する。

筋ミトコンドリア機能解析: ヒト HDL および人工 HDL (FAMP) 添加ヒト HDL を C2C12 培養筋管細胞と 24 時間インキュベーションを行い、細胞酸素消費速度(OCR) (基礎酸素消費量、プロトンリーク量、ATP 産生性酸素消費量、予備呼吸能)をそれぞれ細胞外フラックスアナライザーにて測定することで HDL によるミトコンドリア機能への直接的な作用を検討する。

4. 研究成果

血液中の HDL コレステロール値は比較的安定した脂質パラメーターの 1 つであるが、個々人での HDL のコレステロールレベルは大きく異なることや日本人を含めた東アジア人には比較的多くの CETP 遺伝子変異による高 HDL コレステロール血症を認める者が多い。そのため本研究においては運動による HDL コレステロールの増加作用を明確にするために、血中 HDL コレステロールが比較的低い者を対象として乳酸域値レベルでの中強度有酸素運動による脂質への作用を検討した (表 1)。83 名の HDL コレステロール 50mg/dL 以下の低 HDL の被検者を 3 群に分け、12 週間の運動介入と食事制限の介入を行った。その結果、運動介入群においてのみ +14.0% の有意な血中 HDL コレステロールの上昇が認められた (図 1)。

表 1. 低HDL-C患者における体組成と身体活動レベル

		Total (n=83)	Control (n=27)	Exercise (n=24)	Diet (n=32)
Weight (kg)	0w	73.9 ± 12.4	72.0 ± 9.8	75.4 ± 10.3	74.3 ± 15.6
	12w	71.4 ± 11.5	71.8 ± 10.0	72.2 ± 9.2*	70.4 ± 14.1*
BMI (kg/m ²)	0w	27.8 ± 3.8	27.8 ± 3.7	27.5 ± 3.3	28.1 ± 4.4
	12w	27.0 ± 3.7	27.8 ± 3.7	26.5 ± 3.2*	26.7 ± 4.0*
VO ₂ max.w (ml/kg/min)	0w	22.2 ± 5.6	23.3 ± 4.9	21.3 ± 4.9	21.9 ± 7.0
	12w	22.2 ± 5.8	24.5 ± 6.2	26.2 ± 7.8	23.6 ± 9.5
VO ₂ @ DPBP (ml/min)	0w	576.0 ± 413.6	564.2 ± 423.3	636 ± 413.0	542.2 ± 414.5
	12w	580.0 ± 465.1	551.5 ± 414.6	717.2 ± 515.2	495.7 ± 456.6

* P<0.05 V.S. 0w

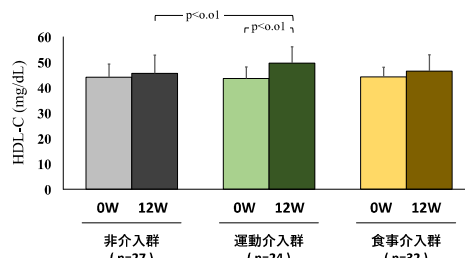


図 1. 低 HDL-C (HDL ≤ 50) 患者における 12 週間の介入前後での HDL-C 値の変化

血中の HDL コレステロールは、2 型糖尿病 / 耐糖能異常や中性脂肪高値によって低下することが広く知られている。この低下メカニズムの詳細は依然として不明であるが、インスリン抵抗性が深く関わっていることが示唆されている。そこで、インスリン抵抗性の代表的病態であるメタボリックシンドローム患者を被検者として、運動による HDL コレステロールの増加作用を検討した (表 2)。47 名のメタボリックシンドローム患者を前記の低 HDL と同様に 3 群に分け、12 週間の運動介入と食事介入を行った。その結果、運動介入群においてのみ有意に +9.0% の血中 HDL コレステロール上昇が認められた。しかしながら、耐糖能をはじめとして他の動脈硬化関連因子のなかで、HDL コレステロールの上昇が認められた運動介入群において有意な変化を示す独立した因子は認められなかった (図 2)。

表 2. メタボリックシンドローム患者における各介入群の血中脂質変化

		Overall (n=47)	Control (n=15)	Exercise (n=17)	Diet (n=15)
HDL-C (mg/dL)	0w	49.6 ± 10.5	52.6 ± 12.2	50.5 ± 10.9	45.6 ± 7.2
	12w	51.2 ± 10.6	50.9 ± 10.0	55.2 ± 12.1*	46.9 ± 8.0
LDL-C (mg/dL)	0w	127.2 ± 33.9	140.1 ± 38.5	119.8 ± 33.5	122.9 ± 27.4
	12w	122.3 ± 32.8	135.5 ± 33.3	116.8 ± 37.9	115.5 ± 23.0
TG (mg/dL)	0w	145.2 ± 71.6	165.3 ± 69.4	118.8 ± 49.5	155.4 ± 89.1
	12w	133.4 ± 84.7	173.8 ± 108.3	107.9 ± 53.6	122.1 ± 77.5†
T-Chol (mg/dL)	0w	208.1 ± 40.8	229.0 ± 45.0	198.3 ± 38.3	198.3 ± 33.2
	12w	203.2 ± 42.8	223.1 ± 45.6	199.0 ± 44.2	188.1 ± 32.2†

*. p<0.01 v.s. 0w; †. p<0.05 v.s. 0w

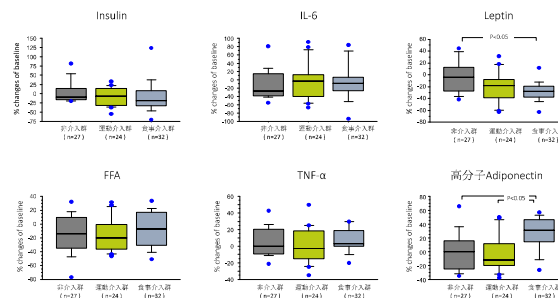


図 2. メタボリックシンドローム患者における 12 週間の各介入での血中動脈硬化因子の変化

運動による HDL 上昇メカニズムを解明するため、C57BL6J マウスを 6 週間の回転ホイールを用いた自発運動をさせたところ、中性脂肪は低下していたにもかかわらず血中 HDL コレステロールおよび HDL の主要蛋白であるアポ蛋白 A-I (ApoA-I) は何れも有意な上昇が認められなかった。これは高脂肪食負荷モデルにおいても同様の結果であった。これらの結果はマウスが CETP を持たず、血中コレステロールの大部分を HDL が保持しているため、運動による HDL コレステロール増加がコレステロールの消費でマスク (ヒトであれば LDL コレステロール低下) されている可能性が考えられた (図 3)。

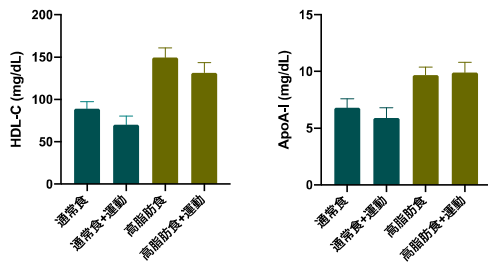


図3. 通常食および高脂肪食投与マウス (C57BL6J) において、6週間の回転ホイールによる自発運動がHDLコレステロールへおよびす影響 (n=8-14)

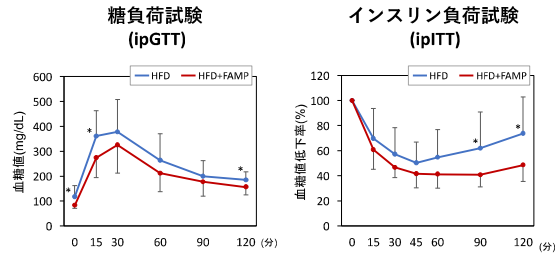


図4. 高脂肪食負荷マウス (C57BL6J) において、6週間 (週5回腹腔内投与) の人工HDL (FAMP 50mg/kg/day) 投与による耐糖能・インスリン感受性におよぼす影響. n=8 each, * P<0.05

一方、インスリン抵抗性モデルである高脂肪食負荷 (C57BL6J) マウスモデルにおいて、人工 HDL である FAMP を 6 週間投与すると血中 HDL コレステロールレベルの上昇は認めないが、糖負荷試験 (ipGTT) において有意な耐糖能改善効果が認められていた。またさらにインスリン負荷試験 (ipITT) においても有意な血糖低下が認められていたことから、人工 HDL はインスリン抵抗性を改善することによって耐糖能を改善している所見であった (図4)。

運動による HDL コレステロール上昇のメカニズムは、その代謝機構の複雑さと、齧歯類での HDL 代謝がヒトと大きく異なっていることから依然として不明である。しかしながら、本研究において、ヒトが運動によって HDL コレステロールが上昇することは明らかにすることが出来た。特に HDL が低い者ではその効果は強く認められていた。また、運動によって HDL コレステロール上昇と耐糖能改善が認められることは周知されているが、HDL コレステロールと耐糖能との関連性は不明である。この2つのファクターは一見、直接的な関連性はない様に思われるが、本研究でのマウスを用いた検討において、人工 HDL 投与がインスリン抵抗性の改善を認めていることから、HDL と耐糖能との間には直接的な関連性があることが強く示唆される。我々は運動が HDL の産生を増加することで、それが自身の骨格筋に働き最終的にインスリン抵抗性を改善しているのではないかとという1つの仮説を立てている。この仮説の証明のために培養骨格筋細胞 (C2C12 筋芽細胞) を用いて、HDL 添加による細胞ミトコンドリア機能解析を行った。その結果、ヒト HDL はミトコンドリア機能を向上させることが明らかになった (図5)。また、人工 HDL でも同様に骨格筋細胞のミトコンドリア機能を向上させていた (図6)。

ところが興味深いことに、*in vitro* で人工 HDL とヒト血漿 HDL を pre-incubate したものを培養骨格筋細胞に添加すると、ヒト HDL において上昇するミトコンドリア機能が逆に用量依存的に低下することが明らかになった (図7)。この結果は、前述の結果と相反するようであるが、人工 HDL は *in vivo* では HDL 代謝によって HDL 粒子は変化せずに代謝回転が速まることを報告し、一方で *in vitro* で HDL に作用させると、全ての HDL 粒子の小型化が生じる事がこれまでの研究によって判明している。つまり HDL の骨格筋ミトコンドリア機能への向上作用は、HDL 粒子径に大きく関連している証拠であると考えられる。このことから、運動による HDL コレステロール上昇と耐糖能との間には、HDL 粒子の大きさの変化が深く関与しているのではないかと推察される。また、2型糖尿病をはじめインスリン抵抗性の病態では HDL コレステロールが低下することが広く信じられているが、本研究の結果からは、骨格筋を介して HDL 低値が逆にインスリン抵抗性を引き起こしていることを示唆しているかもしれない。

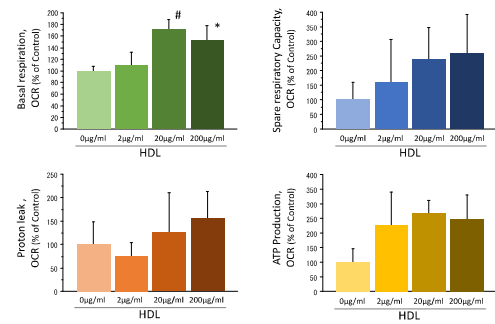


図5. C2C12筋芽細胞への24時間のヒトHDL添加がミトコンドリア機能へおよびす影響

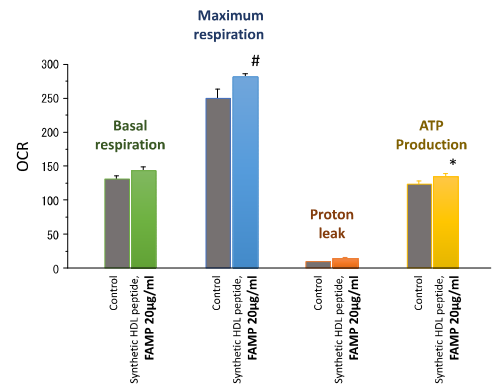


図6. C2C12筋芽細胞への24時間の人工HDL (FAMP) 添加がミトコンドリア機能へおよびす影響. N=3-5; #, P<0.05; *, P<0.1

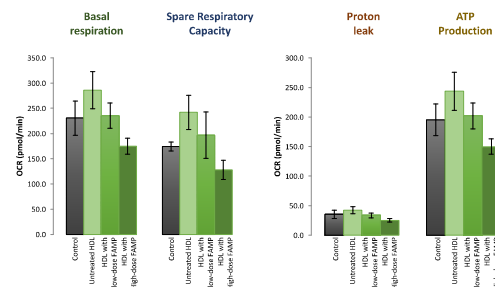


図7. C2C12筋芽細胞への24時間の人工HDL (FAMP) を pre-treatment した HDL の添加がミトコンドリア機能へおよびす影響. N=3-5; #, P<0.05; *, P<0.1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yusuke Goto, Yoshinari Uehara
2. 発表標題 Effects of Aerobic Exercise on High-density Lipoprotein Metabolism
3. 学会等名 1st Asia-Pacific CardioMetabolic Syndrome Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshinari Uehara, Yusuke Goto
2. 発表標題 High-density Lipoprotein Upregulates Mitochondrial Function in Cultured Myoblast Cells
3. 学会等名 1st Asia-Pacific CardioMetabolic Syndrome Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiro Komatsu, Satomi Abe, Shihoko Nakashima, Eri Soneda, Yasuki Higaki, Yoshinari Uehara
2. 発表標題 Canagliflozin, a SGLT2 inhibitor improves skeletal muscle function in high-fat diet-fed obesity mice.
3. 学会等名 American Heart Association, Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Soneda E, Nakashima S, Abe S, Komatsu T, Higaki Y, Uehara Y
2. 発表標題 Ketone bodies increase mitochondrial respiration in skeletal muscle C2C12 cells
3. 学会等名 3rd Asia-Pacific CardioMetabolic Syndrome (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 佑介, 中島 志穂子, 阿部 智美, 田中 宏暁, 檜垣 靖樹, 上原 吉就
2. 発表標題 高比重リポ蛋白 (HDL) が骨格筋ミトコンドリア機能へ与える影響
3. 学会等名 第72回日本体力医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taiki Yamamoto, Yusuke Goto, Yoshinari Uehara
2. 発表標題 Aerobic exercise elevates high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in patients with low-HDL cholesterolemia
3. 学会等名 23rd International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshinari UEHARA
2. 発表標題 Aerobic Exercise Elevates High-density lipoprotein (HDL) Functions in Patients with Metabolic Syndrome
3. 学会等名 The 7th International Congress on Lipid & Atherosclerosis (ICoLA 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eri Soneda, Shihoko Nakashima, Satomi Abe, Tomohiro Komatsu, Taiki Yamoto, Yasuki Higaki, Yoshinari Uehara
2. 発表標題 Roles of ketone body for cellular energy metabolism in obesity and metabolic syndrome
3. 学会等名 2nd Asia-Pacific CardioMetabolic Syndrome (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 宏暁 (TANAKA Hiroaki) (00078544)	福岡大学・スポーツ科学部・非常勤講師 (37111)	
研究分担者	朔 啓二郎 (SAKU Keijiro) (40183371)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	
研究分担者	檜垣 靖樹 (HIGAKI Yasuki) (10228702)	福岡大学・スポーツ科学部・教授 (37111)	
研究分担者	川中 健太郎 (KAWANAKA Kentaro) (80339960)	福岡大学・スポーツ科学部・教授 (37111)	
研究分担者	松村 剛 (MATSUMURA Takeshi) (20398192)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	松永 洋一 (MATSUNAGA Youichi) (80239053)	徳島文理大学・薬学部・教授 (36102)	