

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01843

研究課題名(和文) 骨格筋由来の細胞外小胞を介した新しい代謝促進メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of new metabolism promotion mechanism through extracellular vesicles derived from skeletal muscle

研究代表者

小林 由直 (Kobayashi, Yoshinao)

三重大学・保健管理センター・教授

研究者番号：70378298

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)：肝細胞および脂肪細胞由来の血中EV数は、非アルコール性脂肪生肝疾患(NAFLD)に關与する様々なメタボリック因子と相関することが明らかになり、EVは肝臓、脂肪組織、骨格筋などの臓器における脂質・糖代謝などの代謝異常を反映するバイオマーカーであることが示された。

強度インターバルトレーニング運動負荷(HIIT-Ex)は、心肺や筋肉への負荷を伴いながら血中のEV数および成分を有意に変化させることが明らかになった。EV成分のプロテオミクス解析により、EVに含まれるタンパク質は、HIIT-Exにより引き起こされる全身臓器の様々な代謝調節に關与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中の細胞外小胞の数および成分は、メタボリック症候群における全身の代謝異常を反映することが明らかになり、その時の健康状態を評価するための指標(バイオマーカー)になることが示された。

運動により血液中の細胞外小胞の数と構成タンパク質が変化することが明らかになり、構成タンパク成分の変化を通して運動により引き起こされる生体内の様々な代謝調節反応を評価することができ、健康増進に必要な運動の設定に役立つ情報が得られることが示された。

研究成果の概要(英文)： We explored the association between circulating extracellular vesicles (EVs) level and various metabolic parameters, including obesity and lipid and glucose metabolisms, among 203 subjects with or without risk factor for metabolic diseases. Circulating EV number was significantly higher in men than in women. Circulating EV number correlated most strongly and significantly with elevated triglyceride. Circulating EVs represent a promising metabolic biomarker for lipid and glucose metabolism and have potential for monitoring metabolic status in humans, including individuals without metabolic risk factors.

In addition, we revealed that high intensity intermittent training exercise (HIIT-Ex) significantly influenced circulating EV number along with pulse rate, BP, and catabolism of skeletal muscle. Furthermore, HIIT-Ex promoted changes in EV protein composition, indicating that EVs intercommunicate across various organs in response to HIIT-Ex.

研究分野：健康増進

キーワード：細胞外小胞 メタボリック症候群 運動 プロテオミクス解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

日本はかつてない高齢化社会を迎え、健康で長寿を全うする為に運動は欠かせない要素である。一方、就労世代でもメタボリック症候群が問題になっており、メタボリック症候群の予防手段として運動の重要性は日増しに増加している。厚生労働省においても健康作りのための身体活動基準が作成され、身体活動指針(アクティブガイド)とともに国民に公開され、適切な運動が推奨されている。運動は体脂肪および内臓脂肪を減らし、筋肉量を増加させ、糖代謝や脂肪代謝を促進しメタボリック関連因子に有益な作用をもたらすことは良く知られている。

代謝を担う3大臓器として肝臓-骨格筋-脂肪組織があげられ、ヘパトカインミオカイン、アディポカインなどの液性因子を分泌することで他臓器の炎症や代謝を調整している事が明らかにされている。研究代表者らはNAFLD患者の栄養評価とメタボリック関連パラメーターの検討や(Iwasa M et al. *Obes Res Clin Pract.* 2015, *Nutrition.* 2013 等)、骨格筋量の減少(サルコペニア)が肝機能に及ぼす影響の検討も行ってきた(Kobayashi Y et al. *Intern Med.* 2016, Iwasa M et al. *Nutrition.* 2015 等)。この成果からも、骨格筋-肝臓-脂肪組織は協調して全身の代謝を調節している事が証明できたが、これまで知られている骨格筋から分泌される「ミオカイン」、肝臓から分泌される「ヘパトカイン」、脂肪組織から分泌される「アディポカイン」だけでは骨格筋-肝臓-脂肪組織の臓器間クロストークを説明できず、新たな液性因子の存在が示唆されてきた。

近年、細胞から放出される細胞外小胞(EV: Extracellular vesicles)の存在が明らかにされ、研究代表者らは、肝細胞(Eguchi A et al. *Hepatology.* 2016, Povero D et al. *Science Signal.* 2013)や脂肪細胞(Eguchi A et al. *PLoS One.* 2015)由来のEVは標的細胞のシグナル伝達に影響を与えることや、脂肪細胞由来のEVが肝臓に影響を与える臓器間伝達物質である可能性(Eguchi A et al. *in preparation*)を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

- (1) メタボリック関連因子と血中EVの相関を明らかにする。
- (2) 運動により血中のEV数およびEV成分がどのように変化するかを明らかにし、放出されたEVを通じた全身の臓器間ネットワークの存在を明らかにする。

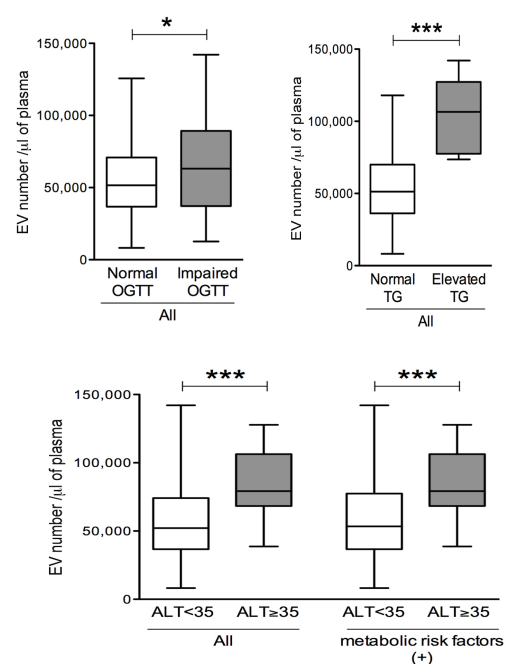
## 3. 研究の方法

- (1) 三重県熊野市御浜町住民糖尿病健診受診者203名(男性76名、女性127名、年齢中央値54歳)を対象として、十分なインフォームド・コンセントを得た上で、日常生活における運動調査、身体測定・体組成分析を行い、75gブドウ糖負荷試験(OGTT)を行った。血液サンプルから、各種メタボリック関連因子の測定やEV数の測定を行い、メタボリック関連因子とEV数の相関を統計学的に解析した。EV数は、既報(Eguchi A et al. *J Mol Med* 2016)で確立された方法を用いて、超遠心および蛍光フローサイトメトリー法にて測定した。
- (2) 上記の対象者において、臓器特異的な血中EV蛋白成分をウェスタンブロット法により同定した。
- (3) 健常成人男性17名(年齢中央値20歳)に自転車エルゴメーターを用いて高強度インターバルトレーニング High intensity interval training (HIIT)による運動負荷を行い、負荷前後で血液生化学データおよび血中EV数の変動を測定した。

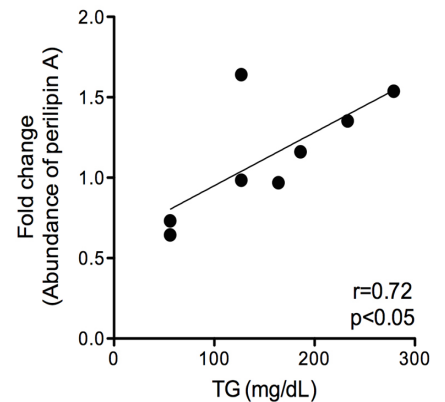
- (4) 質量分析 (nano-LC-MS/MS) を用いて HIIT 運動負荷により血中に放出された EV のプロテオミクス解析(蛋白の同定および定量解析)を行い、KEGG パスウェイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) OGTT において異常パターン(境界型および糖尿病型)を示した群は、正常パターン群に比べ有意に血中 EV 数が増加した ( $P<0.05$ )。血清中性脂肪 (TG) 高値群 ( $\geq 150\text{mg/dL}$ ) は、TG 正常群に比べて有意に血中 EV 数が増加した ( $P<0.001$ )。血中 EV 数は血清 TG 値と有意な正の相関を示した ( $r=0.72, P<0.05$ )。全ての対象者において ALT 高値群 ( $\geq 35\text{ IU/L}$ ) における血中 EV 数は、正常群に比べ有意に高値であった ( $P<0.001$ )。メタボリック因子を持つ群においても、ALT 高値群における血中 EV 数は、正常群に比べ有意に高値であった。



(2) EV の蛋白成分解析では、CD9 などの EV マーカーに加え、主に脂肪細胞に由来する Perilipin A および肝細胞に由来する Asialoglycoprotein receptor 1 (ASGPR1) が検出された。EV における ASGPR1 の発現量はメタボリック因子を有する群において有意に高値であり ( $P<0.05$ )、EV における Perilipin A の発現量は血清 TG 値と有意な正の相関を示した ( $r=0.72, P<0.05$ )。多変量解析において血中 EV 数は、TG ( $r=0.634, P<0.001$ ) および HOMA- $\beta$  ( $r=0.166, P=0.018$ ) と有意な相関を示し、メタボリック因子を持たない群においては、TG ( $r=0.538, P=0.011$ ) に加え、骨格筋量 ( $r=1.000, P=0.041$ ) とも有意な相関を示した。



これらの結果より、NAFLD に関与するメタボリック因子の上昇により肝細胞および脂肪細胞由来の血中 EV 数は増加することが明らかになり、血中 EV は、肝障害および脂質・糖代謝などの代謝異常を反映するバイオマーカーであり、NAFLD 患者において細胞間コミュニケーションにより肝臓、脂肪組織および骨格筋における代謝調節に関与している可能性が示唆された。

(3) HIIT 運動負荷により、収縮期血圧 ( $P<0.01$ )、拡張期血圧 ( $P<0.001$ ) および脈拍 ( $P<0.001$ ) は有意に変動した。120 分後の血清遊離脂肪酸は、運動負荷前に比較して有意に上昇した ( $P<0.05$ )。HIIT 運動負荷直後には、11 名 (64.7%) で血中 EV 数の上昇が見られた (EV 上昇群)。しかし負荷学生全体の 30 分後および 120 分後の EV 数は直後の EV

数に比べ有意に低下した ( $P<0.05$ )。EV 上昇群では、上昇しなかった群に比べて、運動負荷前の EV 数が有意に低く ( $P<0.05$ )、運動負荷直後の収縮期血圧および負荷前の血清クレアチニン値に対する 120 分後の血清クレアチニン値の比が有意に高かった (それぞれ  $P<0.01$ 、 $P<0.01$ )。これらの結果より、負荷前のメタボリックストレスが低く、HIIT によって強い心肺および筋肉負荷がかかった時に EV が血中に放出されると考えられた。

- (4) 質量分析 (nano-LC-MS/MS) を使ったプロテオミクス解析により、HIIT 運動負荷前後において 558 の EV 蛋白質が同定された。nano-LC-MS/MS による定量解析により、これらのうち 49 の EV 蛋白質が HIIT 運動負荷直後または 30 分後において負荷前の 1.5 倍以上に増加していることが明らかになった。増加した EV 蛋白質に対する KEGG パスウェイ解析により、これらの蛋白質は、凝固系亢進、細胞外マトリックス蛋白質の調節、酸化ストレスの除去、および酸塩基平衡の補正など、多くの経路に関与していることが明らかになった。

これらの結果より、HIIT 運動負荷は、心肺や筋肉への負荷を伴いながら血中の EV 数を有意に変化させ、EV を構成する蛋白成分の変化を介して運動負荷に反応した多臓器間相関に関与していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Y, Eguchi A, Tempaku M, Honda T, Togashi K, Iwasa M. et al.	4. 巻 315
2. 論文標題 Circulating extracellular vesicles are associated with lipid and insulin metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 E574, E582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00160.2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Y, Eguchi A, Tamai Y, Fukuda S, Tempaku M, Izuoka K, Iwasa M, Takei Y, Togashi K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Protein Composition of Circulating Extracellular Vesicles Immediately Changed by Particular Short Time of High-Intensity Interval Training Exercise	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Physiol.	6. 最初と最後の頁 693007, 693007.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2021.693007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshinao Kobayashi, Yasumasa Tamai, Akiko Eguchi, Motoh Iwasa, Yoshiyuki Takei
2. 発表標題 Changes in serum bile acids concentrations and components associated with reduced skeletal muscle volume in NAFLD
3. 学会等名 Annual meeting of American Association for the Study of Liver disease (AASLD) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江口暁子 小林由直 天白美奈 岩佐元雄 竹井謙之
2. 発表標題 非アルコール性肝炎に関連するメタボリックリスク因子の上昇により肝細胞や脂肪細胞由来のExtracellular vesicle数が増加する
3. 学会等名 第9回肥満と消化器疾患研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshinao Kobayashi, Yasuyuki Tamai, Akiko Eguchi, Mina Tenpaku, Ryota Shigefuku, Motoh Iwasa, Yoshiyuki Takei
2. 発表標題 Association among serum bile acids, liver fibrosis and skeletal muscle volume in NAFLD and biological effects of bile acids on skeletal muscle
3. 学会等名 Annual meeting of American Association for the Study of Liver disease (AASLD) (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	江口 暁子 (Eguchi Akiko)  (00598980)	三重大学・医学系研究科・特任講師(研究担当)  (14101)	

	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
研究協力者	竹井 謙之 (Takei Yoshiyuki)		
研究協力者	岩佐 元雄 (Iwasa Motoh)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------