

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11434

研究課題名(和文)新規核酸バイオマーカー cfDNAのオーダーメイド運動処方への応用

研究課題名(英文) Dynamics of cfDNA fragments and concentration during Exercise

研究代表者

川上 康 (KAWAKAMI, YASUSHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：70234028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、海外の先行研究により、血中cfDNAが、健康な人を対象とした様々な運動直後で一過性の増加を示すことが多数報告された。血中cfDNA濃度は( )運動開始と中止に速やかに反応する、( )運動量と濃度が比例する、( )運動に伴う炎症、疲労・ストレス、筋損傷のすべてのファクターを単独で検出できる、という3つの特徴があり、日常的に測定するのが難しい運動による消費エネルギーを簡便に評価する指標になる可能性が示唆されていた。最近、研究代表者らは独自に( )尿中cfDNA測定も、血中cfDNA測定とほぼ同様の動態を運動負荷に対して示すことをしめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「運動効果の客観的評価」の困難さ、および今後の運動処方・計画のオーダーメイド化の必要性と有用性：従来から多数の運動マーカーは、それぞれ一長一短があり一般化していない。従って、運動処方・計画は依然としてアスリートの自己申告と経験とカン頼みの部分が多かった。不適切に過剰な運動は、効用を超えて有害な作用を引き起こし運動はいわば両刃の剣である。「運動の見える化」により、運動によって体内で起きる変化と効果を客観的なパラメーターとして捉えることが出来れば、目的に応じて運動の種目や時間・強度を変え、運動処方のオーダーメイド化が可能となる。結果的に安全・効率的に目的に応じた運動効果を確実に獲得できる。

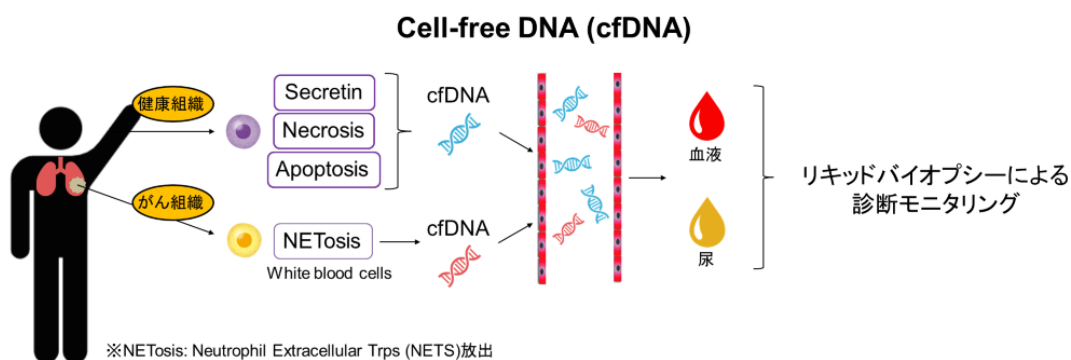
研究成果の概要(英文)：Cell-free DNA (cfDNA) is frequently analyzed using liquid biopsy to investigate cancer markers. We hypothesized that this concept may be applicable for exercise physiology. Here, we aimed to identify cfDNA levels in the plasma as well as urine of healthy humans and define cfDNA dynamics upon extreme exercises, such as running a full marathon. We then used the TaqMan-qPCR assay to investigate the dynamics of cfDNA levels upon running a full marathon. The cfDNA levels approximately 150 bp were significantly increased post-marathon in both plasma and urine. Furthermore, this cfDNA levels approximately 150 bp were strongly correlated with white blood cell and plasma myoglobin concentrations. These results suggest the cfDNA levels identified approximately 150 bp in this study were highly sensitive as markers of extreme physical stress. The findings of this study may provide new insights into exercise physiology in humans.

研究分野：運動生理

キーワード：cfDNA 運動のバイオマーカー NGS

## 1. 研究開始当初の背景

ガン診断分野における最新技術である”Liquid biopsy”は、組織を穿刺することなく血液や尿の cfDNA を用いることで、「無侵襲」かつ「繰り返し」な生体の様々な遺伝子の情報が「核酸マーカー」として得られる。ガン診断以外な有用性が見込まれる。以上より「月経周期を考慮した女性アスリートのコンディショニングおよび FAT の予防・介入」に対して”Liquid biopsy”のコンセプトが十分応用可能であり、かつ社会的な貢献度が高い課題として本研究の着想に至った (図 1)。



### 様々なcfDNAレベル上昇の報告

1. 細胞ダメージ・炎症 (Pokrywka A et al., Arch Med Sci, 2015)
2. 癌や自己免疫疾患などの様々な疾患 (Jiang P et al., Trends Genet, 2016)
3. 精神ストレス (EM Hummel et al., Translational Psychiatry, 2018)
4. 運動・加齢 (Atamaniuk J et al., Eur Appl Physiol, 2008) (Tsu-Lan Wu et al., Clin Chim Acta, 2002)

図-1

## 2. 研究の目的

「運動効果の客観的評価」の困難さ、および今後の運動処方・計画のオーダーメイド化の必要性と有用性：従来から多数の運動マーカーは、それぞれ一長一短があり一般化していない。従って、運動処方・計画は依然としてアスリートの自己申告と経験とカン頼みの部分が多かった。不適切に過剰な運動は、効用を超えて有害な作用を引き起こし運動はいわば両刃の剣である。「運動の見える化」により、運動によって体内で起きる変化と効果を客観的なパラメーターとして捉えることが出来れば、目的に応じて運動の種目や時間・強度を変え、運動処方のオーダーメイド化が可能となる。結果的に安全・効率的に目的に応じた運動効果を確実に獲得することができる。

## 3. 研究の方法

cfDNA 抽出：血中 cfDNA は、Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Micro Kit (Norgen Biotek Inc., Canada)。尿中 cfDNA は、Urine Cell-Free Circulating DNA Purification Midi Kit (Norgen Biotek Inc., Canada) を使い、そ

それぞれ説明書にしたがって抽出した。それらを Agilent2100 Bioanalyzer による電気泳動解析により評価した。

#### 4. 研究成果

研究代表者らにより、新規運動誘発性バイオマーカーとして Cell Free DNA (cfDNA) の優れた特性を生かすことで、「運動量効果の見える化」の可能性が示された (p3, 図 2. 3 参照) : 近年、海外の先行研究により、血中 cfDNA が、健康な人 (主に男性) を対象とした様々な運動直後で一過性の増加を示すことが多数報告された。血中 cfDNA 濃度は I) 運動開始と中止に速やかに反応する (図 3, 2) -a)、II) 運動量と濃度が比例する (図 2)、III) 運動に伴う炎症、疲労・ストレス、筋損傷のすべてのファクターを単独で検出できる、という 3 つの特徴があり、日常的に測定するのが難しい運動による消費エネルギーを簡便に評価する指標になる可能性が示唆されていた。最近、研究代表者らは独自に下記の IV~VII の 4 点を明らかにして、論文および bioRxiv として発表している (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.06.434188v1>)。IV) 尿中 cfDNA 測定も、血中 cfDNA 測定とほぼ同様の動態を運動負荷に対して示す。V) 時間の経過でサイズの異なる cfDNA 断片が増加する (図 3, 2) -b)。急速に増加する短い cfDNA 断片は腎機能と関係した。他方、2 時間以降に増加する長い cfDNA 断片 (1000bp 以上) は CK や MB の如き筋損傷マーカーと相関を認めた。VI) cfDNA 濃度に性差を認めた。つまり、「血中濃度; 男性>女性」、「尿中濃度; 女性>男性」。VII) cfDNA の塩基配列を NGS 解析により解析することで、当該運動に特異的な運動マーカーを得る方法を考案した。 (図 3-3) -c, -f)。これは、独自で全く前例のない斬新な方法である。

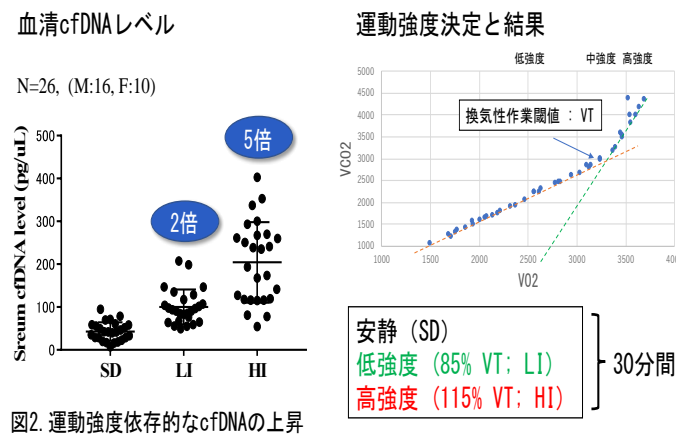


図2. 運動強度依存的なcfDNAの上昇

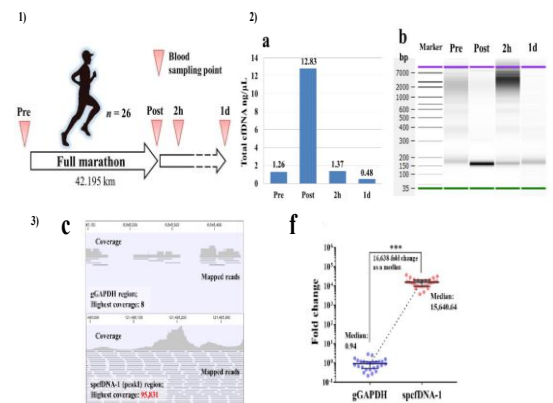


図3. 運動 (フルマラソン) によるcfDNAの応答

図2 運動強度依存的な血中 cfDNA の上昇 (bioRxiv より)

血中 cfDNA レベルの上昇は、座位安静、低強度 (85 % VT)、高強度 (115 % VT) 強度依存的であった。

図3 運動 (フルマラソン) による血中 cfDNA の応答及び NGS 応用 (申請者らの ④: *Genes (Base1)*, 2021 Apr より引用)

1. フルマラソンのプロトコール 2-a. 運動により急峻に増加、中止後に速やかに低下する。 b. バイオアナライザーによる解析結果である。cfDNA の量が運動直後に増加して、時間の経過でサイズの異なる cfDNA 断片の増加を捉えた。 3. cfDNA の塩基配列を NGS 解析により解析し、ChIP アッセイ (転写因子を同定する手法) により、染色体に MAPPING したところ、運動後に二番染色体のセントロメア近傍に特異的な塩基配列の増加を認めた (-c)。これらの塩基配列を基にプライマーを設計したところ、超高感度な運動反応マーカーを得られた (-f)。これは本マラソン競技に特異的なマーカー二と考えられる。

## 論文

Sugasawa T. (4名省略), Kawakami Y., Takekoshi K. Dynamics of Specific cfDNA Fragments in the Plasma of Full Marathon Participants. *Genes (Basel)*. 2021;12:676. [IF = 3.759]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugasawa Takehito, Fujita Shin-ichiro, Kuji Tomoaki, Ishibashi Noriyo, Tamai Kenshirou, Kawakami Yasushi, Takekoshi Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Dynamics of Specific cfDNA Fragments in the Plasma of Full Marathon Participants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 676 ~ 676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12050676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	前田 清司 (MAEDA SEIJI) (30282346)	筑波大学・体育系・教授  (12102)	
研究分担者	竹越 一博 (TAKEKOSHI KAZUHIRO) (40261804)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	

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
---------	---------