

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0230

研究課題名（和文）運動により分泌されるエクソソームの機能解析と生理的役割の解明

研究課題名（英文）Functional analyses and physiological role of exosomes secreted by exercise

研究代表者

鈴木 克彦（Suzuki, Katsuhiko）

早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授

研究者番号：80344597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表者の鈴木はマウスを用いた動物実験で高脂肪食による肥満モデルに運動トレーニングを行い、各組織からのエクソソームの抽出法について比較検討を重ね、今後の研究に用いる手法について知見を得ることができた。エクソソームのマイクロRNAの解析については、研究分担者の川西が測定系の基礎検討を行い、収縮骨格筋から分泌されるエクソソームの特徴を解析し、研究成果を論文化することができた。またコロナ禍であったにも関わらず、分担者の河村はハンガリースポーツ科学大学に留学し、国際共同研究で心肺体力とDNAメチル化に基づく生物学的老化との関係を明らかにする研究で論文を発表することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではエクソソームの抽出法や解析・評価法について検討を進め、骨格筋の収縮によって血中にエクソソームが放出され、それが臓器連関のメディエーターとして標的臓器に作用し運動効果を担う可能性の一端を示すことができた。今後は、人を対象とする臨床試験を実施し、疾病予防効果や病態改善効果とそれらのメカニズムを解明していきたい。また、ハンガリースポーツ科学大学に出張した研究分担者で若手研究者の河村らが新しい分子生物学的解析法を習得し、運動や老化との関連を研究し成果をあげることができたため、今後も国際共同研究を多方面に発展させ、さらに総合的な研究を展開できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the principal investigator, Dr Suzuki, conducted a physical exercise training study using normal and obesity mice fed by normal and high-fat diet, respectively, and investigated the extraction methods of exosomes from various organs/tissues. The allotted researcher, Dr. Kawanishi, set up the analytical methods of microRNA included in the exosomes using next generation sequencer, characterize them released from the contracting skeletal muscle, and published an original article in American Journal of Physiology. Another allotted young researcher, Dr. Kawamura, went to the Hungarian Sport Science University even during the COVID-19 pandemic, collaborated internationally with Professor Radak's laboratory team to investigate the relationships among cardiorespiratory fitness and DNA methylation-based biological aging, and published original articles in the Aging Cell and Frontiers in Nutrition.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：運動 エクソソーム 分子生物学的解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞から分泌されるエクソソームとよばれる顆粒がさまざまな生理作用を有することが明らかにされている。本研究課題では、血液や骨格筋の培養液などからエクソソームを単離・回収し、細胞内代謝環境の変化や筋収縮の刺激に伴うエクソソームの量的・質的変動を明らかにし、運動に伴う骨格筋由来の生理活性因子による生体調節機構に新たな知見を得ることを目的とした。

2. 研究の目的

エクソソームは、生理的条件下に反応してさまざまな細胞から分泌される脂質二重膜の細胞外小胞である。エクソソーム内部には、miRNA や mRNA などの核酸やタンパク質等の細胞内成分が含まれており、細胞間の情報伝達を担うとされている。そこで本研究では、骨格筋由来のエクソソーム内包物のプロファイリング解析から、運動や筋収縮が影響するエクソソームの機能性変化について、包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、電気刺激による筋収縮および持久的運動の負荷により分泌されるエクソソームの機能解析を行った。具体的には、安静マウスおよび電気刺激負荷マウス、持久的運動負荷マウスから精製した血清エクソソームを骨格筋細胞および脳神経細胞に添加して、細胞の増殖能や分化能の違いを検証した。さらに、血液および骨格筋の培養上清からエクソソームを精製して、大規模並列シーケンサーを用いた各種 RNA の網羅的発現解析を行い、運動・筋収縮を反映する新規バイオマーカーを探索した。

4. 研究成果

初年度には、マウスの血液および採取したマウス骨格筋組織の培養液からポリマー沈殿法によりエクソソームを含む細胞外小胞を精製して、大規模並列シーケンサーを用いたエクソソームが含有するメッセンジャーRNA(mRNA)やマイクロRNA(microRNA)の網羅的発現解析の解析手法の確立を行った。確立した解析法を活用して、マウス骨格筋に電気刺激による筋収縮を負荷した条件下での血清エクソソームに含有する microRNA および mRNA の発現プロファイルの変動を検証した。その結果、電気刺激直後には7種類の microRNA の増加、電気刺激90分間後には17種類の microRNA の増加と5種類の microRNA の減少を観察した。特に、骨格筋に強く発現することが知られている miR-1、miR-133、miR-206 は電気刺激90分間後に10倍以上に増加することを見出した。また、mRNA は電気刺激直後には252種類の増加と205種類の減少、電気刺激90分間後には335種類の増加と218種類の減少を観察した。さらに、60分間の中強度持久的走行運動を負荷して、血清エクソソームに含有する microRNA の発現プロファイルの変動を検証して、運動直後に4種類の microRNA の増加と2種類の microRNA の減少、90分間後に miR-122 および miR-146 など18種類の microRNA の増加を観察した。

2年目には、マウスから採取した骨格筋組織を用いた *ex vivo* 実験を行い、培養骨格筋から分泌されるエクソソームを対象とした RNA の網羅的な発現解析法を確立した。加齢などにより異常を引き起こした骨格筋ではエクソソーム分泌動態も異常をきたしていることが想定され、分泌異常が様々な病態を引き起こしている可能性があることから、加齢モデルマウスの骨格筋から分泌されるエクソソームを対象として質的な変動解析を行った。4カ月齢の若齢マウスおよび27カ月齢の高齢マウスから採取した培養骨格筋由来のエクソソームの microRNA および mRNA の差次的発現解析を実施した結果、加齢により発現が増減する特異的な microRNA 25種類および mRNA 370種類を見出した。KEGG パスウェイ解析により、加齢により増加する microRNA は Fatty acid metabolism などの代謝経路に影響を及ぼすことが示された。また、これまでに我々は電気刺激による筋収縮負荷がマウス血清エクソソームの microRNA の発現プロファイルを変化させることを明らかにしてきた(第76回日本体力医学会発表)。さらに、筋収縮刺激により分泌される血清エクソソームが脳神経細胞の機能に影響を及ぼす影響について検証した。マウス胎児海馬由来の初代神経細胞に血清エクソソームを添加することによる mRNA の差次的発現解析を実施した結果、筋収縮負荷のマウス血清エクソソームは132種類の mRNA の発現を変化させることを見出した。また、KEGG パスウェイ解析により、神経細胞の増殖・分化に関連する Hippo シグナル伝達経路に影響を及ぼすことが示された。

3年目には、筋収縮刺激により分泌される血中エクソソームが骨格筋細胞の機能に影響を及ぼすかについて検証した。マウス由来の骨格筋細胞株に血清エクソソームを添加することによる mRNA の差次的発現解析を実施した結果として、筋収縮負荷のマウス血中エクソソームは114種類の mRNA の発現を変化させることを見出した。KEGG パスウェイ解析により、MAPK signaling pathway や mTOR signaling pathway などの代謝経路に影響を及ぼすことが示された。また、これらの代謝経路に関連する標的遺伝子は電気刺激により血中エクソソームで変動する microRNA により制御される可能性が示唆された(Kawanishi et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2023)。また、加齢が骨格筋組織由来の分泌エクソソームでの RNA 発現プロファイル

の変動を検証した。若齢マウスおよび高齢マウスから採取した骨格筋の組織培養を行い、培養液中に分泌されたエクソソームに含まれる RNA の差次的発現解析を実施した結果として、加齢により 25 種類の microRNA および 370 種類の mRNA の発現を 変化させることを見出した (第 77 回日本体力医学会, 2022)。さらに、加齢による循環エクソソームにおける RNA の発現プロファイルの変動の解析を行い、その生理学的機能の検証を進め、運動と脳可塑性に関するシステムティックレビューの論文などエビデンスの構築も進め、現象と機能解析およびメカニズムの解明の目途を立てることができた。

また、本研究ではコロナ禍にも関わらず国際共同研究を展開することができた。分担者の河村はハンガリースポーツ科学大学との共同研究で心肺体力と DNA メチル化 に基づく生物学的老化との関係を明らかにする研究で成果をあげることができた。高齢男性 144 名を対象に、心肺体力および生活習慣関連指標と DNA メチル化年齢との関係を検証した。その結果、年齢、飲酒および喫煙などの交絡因子で調整した後も、高い心肺体力が生物学的老化の遅延と関連することが明らかとなった。また、この研究では、心肺体力だけではなく、適切な代謝状態の維持、微量栄養素の十分な摂取、喫煙や過度な飲酒の回避、朝型の生活リズムなどの生活習慣が エピジェネティック時計の進行遅延と関連することが明らかとなった (Kawamura et al., *Aging Cell*, 2024)。次に、心肺体力に基づき繁殖を繰り返したラット系統を対象に、心肺体力と多臓器での生物学的老化との関連を検証した。その結果、高い心肺体力は生物学的老化の指標であるグローバルな平均メチル化レベル (Global Mean DNA Methylation) およびメチル化の混沌状態を表す DNA メチル化エントロピー (Mean DNA Methylation Entropy) の加齢変化を臓器特異的に遅らせることが示された。加えて、この研究では、海馬、心臓、ヒラメ筋および大腸の個別遺伝子のプロモーターメチル化レベルについて、一貫して心肺体力の影響を受ける 7 つの遺伝子と、各臓器別に最も影響を受けるトップヒット遺伝子をそれぞれ特定した。これらから、高い心肺体力は、生物学的老化の臓器特異的な遅延と関連することが示唆された (Kawamura et al., *bioRxiv*, 2024)。各組織からのエクソソームの抽出法についても比較検討を重ね、今後の研究に用いる手法について知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawanihi Noriaki, Tominaga Takaki, Suzuki Katsuhiko.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Electrical pulse stimulation-induced muscle contraction alters the microRNA and mRNA profiles of circulating extracellular vesicles in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpregu.00121.2022	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 -
1. 著者名 Yasuhiro Seki, Dora Aczel, Ferenc Torma, Matyas Jokai, Anita Boros, Katsuhiko Suzuki, Mitsuru Higuchi, Kumpei Tanisawa, Istvan Boldogh, Steve Horvath, Zsolt Radak	4. 巻 24
2. 論文標題 No strong association among epigenetic modifications by DNA methylation, telomere length, and physical fitness in biological aging.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biogerontology	6. 最初と最後の頁 245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する
1. 著者名 Farhani, Farid, Shahnaz Shahrbanian, Mohammad Auais, Amir Hossein Ahmadi Hekmatikar, and Katsuhiko Suzuki.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of aerobic training on brain plasticity in patients with mild cognitive impairment: a systematic review of randomized controlled trials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci12060732	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 該当する
1. 著者名 Orumiyehei, Amin, Kayvan Khoramipour, Maryam Hossein Rezaei, Elham Madadizadeh, Manzume Shamsi Meymandi, Fatemeh Mohammadi, Mohsen Chamanara, Hamideh Bashiri, and Katsuhiko Suzuki.	4. 巻 12
2. 論文標題 High-intensity interval training-induced hippocampal molecular changes associated with improvement in anxiety-like behavior but not cognitive function in rats with type 2 diabetes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 1280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci12101280	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 該当する

1. 著者名 K Suzuki	4. 巻 13(12)
2. 論文標題 Recent progress in applicability of exercise immunology and inflammation research to sports nutrition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 4299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13124299	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5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川西範明、富永貴輝、鈴木克彦
2. 発表標題 加齢による骨格筋由来の分泌エクソソームのmicroRNA発現プロファイルの変動.
3. 学会等名 第77回日本体力医学会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川西範明、富永貴輝、鈴木克彦.
2. 発表標題 電気刺激による筋収縮および持久性運動による血清エクソソームのmicroRNA発現プロファイルの変動の違い
3. 学会等名 第76回日本体力医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川西範明、富永貴輝、鈴木克彦.
2. 発表標題 加齢による骨格筋由来の分泌エクソソームのmicroRNA発現プロファイルの変動.
3. 学会等名 第77回日本体力医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K Suzuki
2. 発表標題 Involvement of Neutrophils in Exercise-induced Muscle Damage and its Prevention
3. 学会等名 The 6th Int'l Conference on Inflammation Research (CIR 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川西範明, 富永貴輝, 鈴木克彦.
2. 発表標題 筋収縮による血清エクソソームの筋収縮による血清エクソソームのm iRNA 発現プロファイルの変動.
3. 学会等名 10回日本運動免疫学研究会スプリングセミナー
4. 発表年 2021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	川西 範明 (Kawanishi Noriaki) (00706533)	千葉工業大学・先進工学部・准教授 (32503)	
研究 分担者	河村 拓史 (Kawamura Takuji) (80823327)	早稲田大学・スポーツ科学学術院・助教 (32689)	

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			
ハンガリー	Research Center	Molecular Exercise	Hungarian University of Sport Science	他3機関
ハンガリー	ハンガリー体育大学			