

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11572

研究課題名(和文)小児肥満における細胞外小胞を介した代謝調節ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of metabolic regulation network via extracellular vesicles in childhood obesity

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満小児を中心に血中細胞外小胞(extracellular vesicle, EV)数やEVに含まれるタンパク質の網羅的解析を行った。その結果、血中EV数は肥満の程度が進むにつれて増加し、EVに含まれるタンパク質の種類や量が変化することが確認された。肥満により量が有意に変化するタンパク質を同定し、各々のタンパク質の相互関係を解析した結果、小児肥満は従来から言われている脂質・糖代謝に影響を与えるのみならず、凝固系、免疫系、ストレス応答、補体活性化、および細胞内輸送など多くの生物学的プロセスに影響を与え、さらに骨格筋・心筋や脳神経系、軟骨・骨格系などの発達にも影響を与えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児肥満のEVに含まれるタンパク質の詳細な解析により、今まで知られていなかった臓器への小児肥満の影響を明らかにすることができた。その結果、小児肥満における全身の病態理解が飛躍的に進んだ。得られた研究成果は、小児肥満の継続が身体発達に及ぼす深刻な影響を明らかにし、将来の健康寿命を伸ばすために小児期に適切な食事・運動療法を行って肥満を解消することの重要性を社会に認識させるのに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In children with normal weight or obesity, we measured the number of extracellular vesicles (EVs) in the blood and performed a comprehensive proteomic analysis of the proteins contained in EVs. As a result, the number of EVs was increased as the degree of obesity progressed, and EV protein signature was significantly different between children with normal weight and those with obesity. By identifying the changed proteins and analyzing their protein-protein interaction, we have demonstrated that childhood obesity not only affects lipid and glucose metabolism, but also affects variety of biological process, including the coagulation system, immune system, stress response system, and complement activation system and intracellular transport. In addition, we uncovered that childhood obesity affects the development of skeletal and cardiac muscle, nervous system, and cartilage-skeletal system.

研究分野：健康増進・予防医学

キーワード：小児肥満 細胞外小胞 プロテオミクス解析

1. 研究開始当初の背景

日本はかつてない少子化・高齢化社会を迎え、健康寿命を伸ばすことは重要な課題である。近年における肥満小児の割合の増加は世界的な課題であり、アジアにおいても大きな問題になっている (Ng M et al. Lancet 2014, Liu W et al. PLoS One 2018)。日本においては、就学前男女小児の約 4%、就学後(7 から 15 歳)男児の 6~10%、就学後女児の 6~8% に肥満が見られる(日本小児科学会、小児肥満ガイド)。小児肥満は高率に成人肥満に移行し、小児期から高血圧、糖尿病や脂質等代謝異常などの、いわゆる生活習慣病を発症することが多い。若年時から生活習慣病を発症することで、将来の健康寿命に大きな影響を与えることが予測されるため、体型が形成され生活習慣が決まる思春期までに治療介入することが必要である。しかし、実際に通学を継続しながら厳密に食事や運動をコントロールするのは困難なことが多く、限られた施設でのみ可能であるのが現状である。

研究代表者らは、これまでに肝細胞 (Eguchi A, et al. *J Mol. Med.* 2020, *Hepatology.* 2017) 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、血中 EV 数が中性脂肪値と強い相関を認め、膵細胞機能 (HOMA-β: homeostasis model assessment-β-cell function) とも有意に相関すること (Kobayashi Y, Eguchi A et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018) などを報告して来た。しかし、これらの成果は成人を対象としたものであり、小児における EV の網羅的解析はこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

小児肥満において、血中 EV 数の変動と各種メタボリック関連パラメーターとの相関を明らかにする。

また、肥満小児の血中に放出される EV はどのような代謝調節を行っており、EV を介した臓器間ネットワークはどうなっているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

国立病院機構三重病院の外来および入院する小児および保護者から十分なインフォームド・コンセントおよびインフォームド・アセントを取得し、インピーダンス法を用いた体組成測定を含む身体データおよび血液データを得た。さらに EV 解析用の血液サンプルを得た。

フローサイトメトリー法とナノトラッキング(NTA)法を用いて、血中 EV 数や EV の粒子径を測定した。

血中 EV 数と様々なメタボリック関連パラメータ (肥満度、体組成、血圧、心拍数、糖・脂質代謝、肝機能など) との相関を解析した。

正常体型または肥満のある小児血液からカラムを用いて EV を精製し、質量分析 (nano-LC-MS/MS) を用いて EV に含まれる蛋白質の網羅的プロテオミクス解析を行った。肥満小児で有意に増加または減少した蛋白を同定し、各蛋白質の機能分析および蛋白質相互関係を Gene Ontology 解析および Pathway 解析により行った。

4. 研究成果

単変量解析において、血中 EV 数は小児肥満度、体脂肪量、収縮期血圧、拡張期血圧、中性脂肪、肝トランスアミナーゼ (ALT) と有意な正の相関を示し、HDL-コレステロールとは有意な負の相関を示した。重回帰分析において、血中 EV 数は中性脂肪 標準回帰回数 = 0.474, $p < 0.001$, 95% CI 0.404-1.041) および小児肥満度 (標準回帰回数 = 0.288, $p < 0.05$, 95% CI 0.090-0.851) が血中 EV 数を決定する独立因子として検出された。

カラムによる分画法を用いた EV 精製では、正常体重の小児および肥満小児から EV を回収でき (図 1)、NTA 法により測定した EV 径は、肥満小児の方が正常体重の小児と比べて有意に大きかった (図 2)。

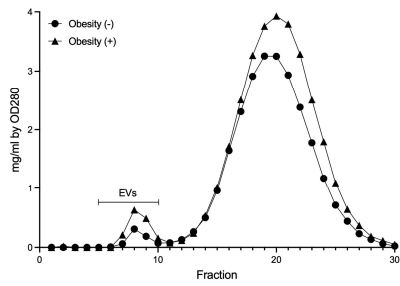


図 1

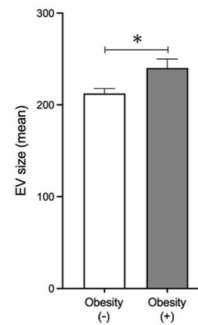


図 2

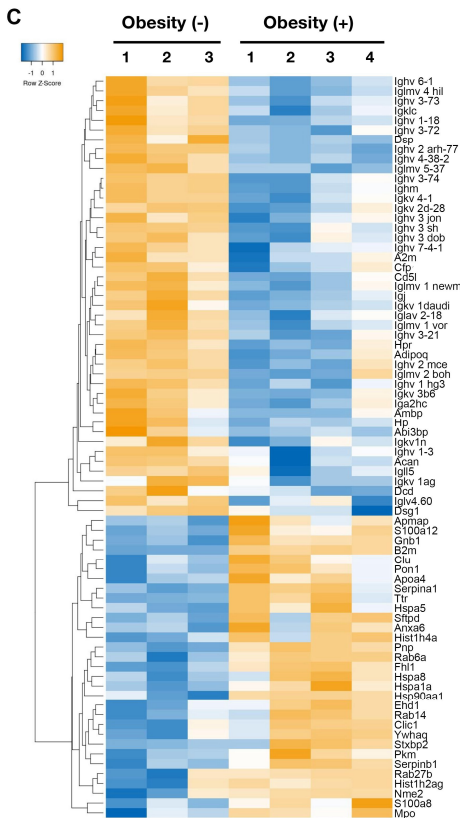


図 3

Protein-protein interaction of up-regulated proteins

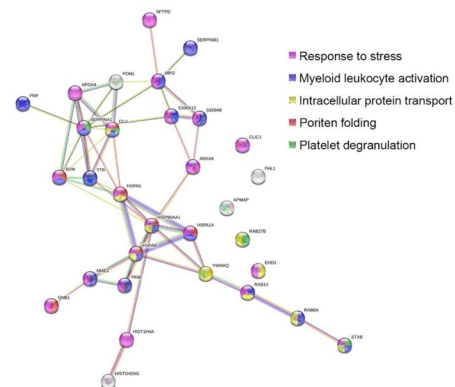


図 4

プロテオミクス解析において、31 の EV 蛋白が肥満により有意に増加していた(図2)。有意に増加した EV 蛋白には、細胞内輸送、蛋白折りたたみ、酸化ストレス、アポトーシス、白血球や血小板の活性化、自然免疫など多彩な生物学的機能を持つものが含まれており、糖・脂肪代謝、骨格筋および心筋の発達、炎症及び免疫系への関与が報告されている蛋白が同定された(図3)。また、種々の癌における発癌及び癌の進展への関与が報告されている蛋白も同定された。さらに、骨格筋や心筋のサルコメア配列に関与する a half LIM domains 1 や神経細胞の発達に影響を与える guanine- nucleotide binding protein 1 や syntaxin-binding protein 2 などが同定された。一方、45 の EV 蛋白が肥満により有意に減少しており、減少した EV 蛋白には、脂質・糖代謝を改善するアディポネクチンをはじめ、関節軟骨や成長板の発達に必要な aggrecan、心筋の発育に必要な desmoplakin、皮膚の自然免疫防御に関与する dermcidin などが含まれていた。さらに、免疫グロブリン (Ig) G、IgM、および IgA の構成や安定化に必要な多数の Ig 構成蛋白も有意に減少していた(図2)。

これらの結果より、小児肥満は従来から言われている脂質糖代謝異常に加え、骨格筋、心筋、神経系及び軟骨組織を含む骨格系の発達、さらに免疫機能にも影響を与えていることが示された。積極的な介入による小児肥満の早期改善は、全身臓器において肥満に関連する多くの生物学的プロセスを改善する可能性が示唆された。

(参考文献： Kobayashi Y, Eguchi A, Imami K, Tempaku M, Izuoka K, Takase T, Kainuma K, Nagao M, Furuta N, Iwasa M, Nakagawa H, Fujisawa T, Togashi K. Circulating extracellular vesicles are associated with pathophysiological condition including metabolic syndrome-related dysmetabolism in children and adolescents with obesity. *J Mol Med.* 2024;102:23-38. PMID: 37874387.)

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 0件）

1. 著者名 Kobayashi Yoshinao, Eguchi Akiko, Imami Koshi, Tempaku Mina, Izuoka Kiyora, Takase Takafumi, Kainuma Keigo, Nagao Mizuho, Furuta Noriko, Iwasa Motoh, Nakagawa Hayato, Fujisawa Takao, Togashi Kenji	4. 巻 102
2. 論文標題 Circulating extracellular vesicles are associated with pathophysiological condition including metabolic syndrome-related dysmetabolism in children and adolescents with obesity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 23～38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00109-023-02386-5	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林由直、江口暁子、玉井康将、岩佐元雄、中川勇人
2. 発表標題 小児肥満における血中細胞外小胞のプロテオミクス解析：NAFLDを含む検討
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshinao Kobayashi, Akiko Eguchi, Koshi Imami, Yasuyuki Tamai, Motoh Iwasa, Hayato Nakagawa
2. 発表標題 Protein barcode of circulating extracellular vesicles in childhood obesity associates with metabolic factors for NAFLD and may affect the future development of muscle and nervous system.
3. 学会等名 Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 由直、江口暁子、天白美奈、竹井謙之
2. 発表標題 肝細胞および脂肪細胞由来の細胞外小胞は成人と小児においてメタボリック状態を反映する
3. 学会等名 第4回消化器臓器関連ネットワーク研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林由直 江口暁子 玉井康将 吉川恭子 杉本龍亮 重福隆太 田中秀明 岩佐元雄 長谷川浩司 竹井謙之
2. 発表標題 男女別小児における血中細胞外小胞とNAFLDを含むメタボリック関連因子との相関
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
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	江口 暁子 (Eguchi Akiko) (00598980)	三重大学・医学系研究科・特任准教授(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	富樫 健二 (Togashi Kenji)		
研究協力者	今見 考志 (Imami Koshi)		
研究協力者	藤澤 隆夫 (Fujisawa Takao)		

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