

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240097

研究課題名(和文) 運動・ストレス・老化に関する新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarkers on exercise, stress and aging

研究代表者

鈴木 克彦 (Suzuki, Katsuhiko)

早稲田大学・スポーツ科学大学院・教授

研究者番号：80344597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,700,000円

研究成果の概要(和文)：運動ストレスに応答するバイオマーカーを検索するため、激運動前後の血液・尿サンプルでプロテオーム解析を行い、運動前後で変動したスポットに関して質量分析装置で同定した。そのうち、尿で顕著な上昇を示した分子についてELISAを構築した。また、血中に存在するマイクロRNAに着目し、マイクロアレイを用いた網羅的解析により一過性レジスタンス運動に応答する複数の血中マイクロRNAを同定し、リアルタイムPCRを用いて発現を定量した。さらに、遺伝子発現の網羅的解析に関しては、特に翻訳動態変化の解析に特化したリボソームプロファイリングの立ち上げに国内で初めて成功し、バイオマーカー開発への応用を開始した。

研究成果の概要(英文)：In order to explore new biomarkers which respond to exercise and stress, we performed proteomics using blood and urine samples before and after exhaustive exercise and identified the molecules using mass spectrometric analyses. Among the molecules which exhibited remarkable increases, we developed measurement system using ELISA. Also, we identified several microRNAs in the blood circulation in response to acute resistant exercise using microarray, and quantified expression levels using real-time PCR. Furthermore, we set up global analyses of translation dynamics using ribosome profiling for biomarker discovery.

研究分野：予防医学

キーワード：バイオマーカー プロテオミクス マイクロアレイ リボソームプロファイリング

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マラソンやトライアスロンのような激運動ではインターロイキン6 (IL-6) の血中濃度が 100 倍も上昇するほか多くのサイトカインの血中・尿中濃度が増加し、これらが生体負担・ストレスの指標となり、持久性運動時のエネルギー供給にも関与することを報告してきた (Suzuki K, et al. Eur. J. Appl. Physiol. 81, 281, 2000; Exerc. Immunol. Rev. 8, 6-48, 2002; Exerc. Immunol. Rev. 9, 48-57, 2003)。また、激運動時には血中白血球の数や機能発現分子、活性酸素産生能が上昇し、骨格筋や全身性の炎症反応にも関与する可能性を報告してきた (Suzuki K, et al. J. Appl. Physiol. 81, 1213-1222, 1996; J. Appl. Physiol. 87, 1360-1367, 1999; Med. Sci. Sports Exerc. 35, 348-355, 2003; Akimoto T, et al. Eur. J. Appl. Physiol. 86, 185-190, 2002)。一方、非侵襲的な生化学的バイオマーカーとして、唾液中の免疫グロブリン A (SIgA) やコルチゾール等を指標として運動やストレスの生体反応を評価し、ストレス、疲労、免疫能の把握における有用性を示してきた (秋本崇之ら・体力科学 46, 523-528, 1997)。このように、研究代表者らは運動によるストレス反応の解析に取り組んできたが、ストレスの生体反応には個人差があり、個々のバイオマーカーを用いてもストレス時の神経系・内分泌系・免疫系の複雑な相互関連性による生理的適応や病態反応を捉えるには限界があるため、機序究明まで含めた統合的なストレス評価システムの開発が必要と考えられる。

研究代表者は免疫能や酸化ストレスの指標である白血球の活性酸素産生能を測定する技術として化学発光法による多検体・多条件同時測定系の開発に携わり、活性酸素分子種の分別測定や種々の細胞内情報伝達経路の刺激を組み合わせた細胞機能解析法を検討してきた (Hasegawa H, Suzuki K, et al. J. Immunol. Methods 210, 1-10, 1997)。しかし化学発光法は感度と定量性に優れているものの、発光量という単一信号のみで活性酸素を測定するため、それ以外の白血球の機能や生体機能分子がどのように関連しているのかを同時に解析するには限界があった。好中球に関しては、細胞が元来有する移動能力 (遊走能) を活用して全血から特殊なハイドロゲルに回収し、その活性酸素産生能をリアルタイムに評価できる測定系を確立し、採血直後の微量全血で活性化好中球の分離と機能解析を行えるように技術開発を行い (鈴木克彦ら・特開 2008-107210) 臨床検査への応用も進めつつある。しかし、全血中の数が少ない単球 (マクロファージの前駆細胞) についてはハイドロゲル素材の最適化が難しく、現状でも単球の機能解

析を行うには分離サンプルを得るのに 50 ml に及ぶ大量の採血が必要である。このように既存の生化学的測定法では、採血量のみならず詳細な活性酸素分子種の産生・代謝の機序究明について多面的な検討に限界があり、この問題解決には新たな解析技術の導入が必要となった。そこで研究代表者らは、従来の生化学的測定法の利点を生かしながら、新たに多面的細胞機能解析技術や遺伝子発現の網羅的解析技術を開発・改良することによって、運動・ストレスに対する生体応答をより鋭敏に検出し、その機序まで含め統合的に解析・評価できるように研究開発を進め、問題解決をはかろうとしている。

2. 研究の目的

現代はストレス社会である。個人レベルでも過重労働や人間関係などの身体的・精神的ストレスは、様々な疾患や免疫能の低下などの健康障害を引き起こす。その対策として有用なストレス評価システムを開発し、ストレスの自己管理や健康診断 (早期発見・早期治療) さらにより積極的な健康増進や生活の質の向上、疾患の予防・治療に役立てることは重要な検討課題と言える。特にストレスの病態は未解明な点が多く、生体のストレス応答や適応の程度を的確に解析・評価できるバイオマーカーを確立することが求められている。そこで本研究では、先端的な分析技術をストレス研究に応用して問題解決型の研究開発に取り組む。

3. 研究の方法

従来の研究から得られた知見をふまえ、運動・ストレスによって血中白血球関連を中心として変動する生体指標を可能な限り組み合わせ、複合的な細胞機能解析法 (セロミクス) の条件設定を行う。次に、網羅的な遺伝子発現・タンパク解析 (ジェノミクス、プロテオミクス) と組み合わせることによって生体反応の包括的解析を実現し、さらに非侵襲的検査法へ応用するために血液以外の唾液、尿などの生体試料にも測定系を移行し、それらの検討を通じて新規バイオマーカーの候補、特性、適用等を明らかにする。研究用途のみならず個人差に着目したオーダーメイド医療、分子予防医学へと応用展開するために、生化学的反応や遺伝子増幅装置 (PCR) 酵素免疫測定法 (ELISA) 等の既に普及している測定系で検討できるように条件設定を行い、あわせて生体影響評価を行い、科学的根拠に関するデータの蓄積を進め、新規バイオマーカーの有用性、妥当性の検証を行う。

4. 研究成果

白血球機能解析法については、ハイドロゲルを用いた新規好中球機能測定法は各

種運動負荷や慢性炎症の状態にあるがん患者で高値となり、抗酸化物質で抑制できることを認め、酸化ストレスの状態をよく反映するバイオマーカーとなりうることを示すことができた。

運動ストレスに応答する新規バイオマーカーを検索するため、初年度に収集した激運動前後の血液・尿サンプルについてプロテオーム解析を行い、二次元電気泳動(2D-DIGE)を実施した後、運動前後で変動したスポットに関して質量分析装置で同定を行った。そのうち、尿で顕著な上昇を示したタンパク分子について、異なるメーカーが市販していた酵素免疫測定法(ELISA)キットを用いて定量し、統計的検定を行ったがいずれも有意差が認められなかった。これは同定されたフラグメントにELISAキットの抗体のエピトープが存在していなかったものと考えられたため、ウェスタンブロット法により当該フラグメントと反応する抗体を選定し、新規のELISAを構築した。

また、血中に存在するマイクロRNAに着目し、マイクロアレイを用いた網羅的解析により一過性レジスタンス運動に応答する複数の血中マイクロRNAを同定した。それらのマイクロRNAについて、リアルタイムPCRを用いて発現を定量した。このうちいくつかのマイクロRNAは、一過性運動によって変動を示した。また、いくつかのマイクロRNAについては血中カテコールアミン、ミオグロビン等と相関関係が認められた。これらのことから、血中マイクロRNAの変動は一過性運動によって変動する血中指標と関連している可能性が示唆された。さらに、加齢や性差が血中マイクロRNAレベルの交絡因子かどうかについての基礎検討を論文としてまとめた。

一方、運動による血中マイクロRNAの変動メカニズムを検討するため、先行研究において運動による骨格筋中での変動が報告されているマイクロRNAに着目した動物実験も行った。運動プロトコールは、先行研究と同一とした。骨格筋サンプルは、遅筋線維から構成されるヒラメ筋と、速筋線維から構成される足底筋を採取した。血液は心臓採血によって採取した。運動を負荷しないマウスをコントロール群とし、運動直後および3時間後の骨格筋と血中のマイクロRNAの変動をリアルタイムRT-PCRで評価した。その結果、すべてのサンプルでマイクロRNAの有意な変動が認められず、骨格筋中のマイクロRNAの変動を前提とした血中マイクロRNAの変動は、実証できなかった。先行研究との結果の不一致に関しては、先行研究における運動負荷時の電気刺激の影響や、採取した骨格筋サンプルの違いによる影響などが考えられた。

遺伝子発現の網羅的解析に関しては、特に翻訳動態変化の解析に特化したリボソ

ームプロファイリングの立ち上げに国内で初めて成功した。さらに、同技術で得られたデータを解析する手法としてバイナリーカウント法を独自に新規開発し、リボソームの動態をこれまでにない高精度で解析可能にした。バイナリーカウント法によりマクロファージ様細胞の翻訳動態を解析した結果、リポ多糖による急性炎症刺激が翻訳中のリボソームの速度を劇的に変化させているという世界で初めての知見を得た。これは、従来知見であるタンパク質の「量」が変化することで生理的变化に応答するというに加え、翻訳速度の変化を介してタンパク質の「形」そして機能が変化しているという生物学的作用機序における新機軸を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計32件)

鈴木克彦, 秋本崇之. 運動ストレスに対するバイオマーカーとしての血中microRNA. 日本補完代替医療学会誌, 9(2), 69-74, 2012.

Suzuki Y, Ohno S, (以下7名の7番目), Suzuki K. Determination of chronic inflammatory states in cancer patients using assay of reactive oxygen species production by neutrophils. Anticancer Res, 32, 565-570, 2012.

Suzuki K, Ohno S, (以下10名). Effect of green tea extract on reactive oxygen species produced by neutrophils from cancer patients. Anticancer Res, 32, 2369-2376, 2012.

Sugama K, Suzuki K, (以下3名). IL-17, neutrophil activation and muscle damage following endurance exercise. Exerc Immunol Rev, 18, 116-127, 2012.

Takahashi M, Suzuki K, Matoba H, Sakamoto K, Obara S, Effects of different intensities of endurance exercise on oxidative stress and antioxidant capacity, J Phys Fitness Sports Med, 1, 183-189, 2012.

秋本崇之, 沢田秀司. 骨格筋とマイクロRNA. 体力科学, 61(1), 61-70, 2012.

佐古博皓, 鈴木克彦. リボソームプロファイリングのバイオマーカー開発への応用. 日本補完代替医療学会誌 10(1), 1-7, 2013.

Takahashi M, Miyashita M, Kawanishi N, Park JH, Hayashida H, Kim HS, Nakamura Y, Sakamoto S, Suzuki K. Low-volume exercise training attenuates oxidative stress and neutrophils activation in older adults. *Eur J Appl Physiol*, 113, 1117-1126, 2013.

Kawanishi K, Kato K, Takahashi M, Mizokami T, Otsuka Y, Imaizumi A, Yano H, Shiva D, Suzuki K. Curcumin attenuates oxidative stress following downhill running-induced muscle damage. *Biochem Biophys Res Commun*, 441, 573-578, 2013.

Kawanishi K, Niihara H, Mizokami T, Yano H, Suzuki K. Exercise training attenuates adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 440, 774-779, 2013.

Sugama K, Suzuki K, Yoshitani Y, Shiraishi K, Kometani T. Urinary excretion of cytokines versus their plasma levels after endurance exercise. *Exerc Immunol Rev*, 19, 29-48, 2013.

Kanda K, Sugama K, Hayashida H, Sakuma J, Kawakami Y, Miura S, Yoshioka H, Mori Y, Suzuki K. Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. *Exerc Immunol Rev*, 19, 74-87, 2013.

Takahashi M, Miyashita M, Park JH, Kawanishi N, Bae S, Nakamura Y, Sakamoto S, Suzuki K. Low-volume exercise training and vitamin E supplementation attenuates oxidative stress in postmenopausal women. *J Nutr Sci Vitaminol*, 59, 375-383, 2013.

Suzuki K, Hashimoto H, Oh T, Ishijima T, Mitsuda H, Peake JM, Sakamoto S, Muraoka I, Higuchi M. The effects of sports drink composition on fluid intake and immunoendocrine responses to cycling in hot conditions. *J Nutr Sci Vitaminol*, 59, 206-212, 2013.

Miyashita M, Park JH, Takahashi M, Suzuki K, Stensel DJ, Nakamura Y. Postprandial Lipaemia: Effects of sitting, standing and walking in healthy normolipidaemic humans. *Int J Sports Med*, 34, 21-27, 2013.

Sakurai R, Fujiwara Y, Saito K, Fukaya

T, Kim MJ, Yasunaga M, Kim H, Ogawa K, Tanaka C, Tsunoda N, Muraki E, Suzuki K, Shinkai S, Watanabe S. Effects of a comprehensive intervention program, including hot bathing, on overweight adults: A randomized controlled trial. *Geriatr Gerontol Int*, 13, 638-645, 2013.

Takahashi M, Miyashita M, Park JH, Kawanishi N, Bae S, Nakamura Y, Sakamoto S, Suzuki K. The association between physical activity and sex-specific oxidative stress in older adults. *J Sports Sci Med*, 12, 571-578, 2013.

Russell AP, Lamon S, Boon H, Wada S, Guller I, Brown EL, Chibalin AV, Zierath J, Snow RJ, Stepto NK, Wadley GD, Akimoto T. Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short term endurance training. *J Physiol*, 591(Pt 18), 4637-4653, 2013.

Sawada S, Kon M, Wada S, Ushida T, Suzuki K, Akimoto T. Profiling of circulating microRNAs after a bout of acute resistance exercise in humans. *PLoS ONE*, 8(7), e70823, 2013.

Kanda K, Sugama K, Sakuma J, Kawakami Y, Suzuki K. Evaluation of serum leaking enzymes and investigation into new biomarkers for exercise-induced muscle damage. *Exerc Immunol Rev*, 20, 39-54, 2014.

Sako H, Suzuki K. Exploring the importance of translational regulation in the inflammatory responses by a genome-wide approach. *Exerc Immunol Rev*, 20, 39-54, 2014.

Takahashi M, Miyashita M, Suzuki K, Bae S, Kim H, Wakisaka T, Matsui Y, Takeshita M, Yasunaga K. Acute ingestion of catechin-rich green tea improves postprandial glucose status and increases serum thioredoxin concentrations in postmenopausal women. *Br J Nutr*, 112, 1542-1550, 2014.

Takahashi M, Suzuki K, Kim HK, Otsuka Y, Imaizumi A, Miyashita M, Sakamoto S. Effects of curcumin supplementation on exercise-induced oxidative stress in humans. *Int J Sports Med*, 35, 469-475, 2014.

Takahashi M, Miyashita M, Park JH,

Sakamoto S, Suzuki K, Effects of breaking sitting by standing and acute exercise on postprandial oxidative stress. *Asian J Sports Med*, 2014 (in press).

Lin SP, Li CY, Suzuki K, Chang CK, Chou KM, Fang SH. Green tea consumption after intense taekwondo training enhances salivary defense factors and antibacterial capacity. *PLOS ONE*, 9, e87580, 2014.

Park JH, Miyashita M, Takahashi M, Kawanishi N, Hayashida H, Kim H, Suzuki K, Nakamura Y. Low-volume walking program improves cardiovascular related health in older adults. *J Sports Sci Med*, 13, 624-631, 2014.

Kim K, Suzuki K, Peake J, Ahn N, Ogawa K, Hong C, Kim S, Lee I, Park J. Physiological and leukocyte subset responses to exercise and cold exposure in cold-acclimatized skaters. *Biol Sport*, 31, 39-48, 2014.

Sawada S, Akimoto T, Takahashi M, Sakurai R, Shinkai S, Ushida T, Fujiwara Y, Suzuki K. Effect of aging and sex on circulating microRNAs in humans. *Adv Aging Res*, 3, 152-159, 2014.

Kon M, Ohiwa N, Honda A, Matsubayashi T, Ikeda T, Akimoto T, Suzuki Y, Hirano Y, Russell AP. Effects of systemic hypoxia on human muscular adaptations to resistance training. *Physiol Rep*, 2(6), pii, e12033, 2014.

Wada S, Kato Y, Sawada S, Aizawa K, Park JH, Russell AP, Ushida T, Akimoto T. MicroRNA-23a has minimal effect on endurance exercise-induced adaptation of mouse skeletal muscle. *Pflügers Archiv*, 467(2), 389-398, 2015.

Sugama K, Suzuki K, Yoshitani Y, Shiraishi K, Miura S, Yoshioka H, Mori Y, Kometani T. Changes of thioredoxin, oxidative stress markers, inflammation and muscle/renal damage following endurance exercise. *Exerc Immunol Rev*, 21, 130-142, 2015.

Suzuki K, Takahashi M, Li C Y, Lin S P, Tomari M, Shing C, Fang S H. The acute effects of green tea and carbohydrate co-ingestion on systemic inflammation and oxidative stress during sprint

cycling, *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015 (in press).

〔学会発表〕(計 24 件)
鈴木克彦. 運動と免疫機能. 日本食品免疫学会 第 8 回学術大会, 東京, 2012.10 (invited).

秋本崇之. 身体運動によるヘルスベネフィットのメカニズムを探る新たな実験モデル. シンポジウム 10「身体運動によるヘルスベネフィットのメカニズムを探る」, 第 67 回日本体力医学会学術総会, 岐阜, 2012.9.

秋本崇之, 相澤勝治, 和田正吾, 福林徹, 牛田多加志. メカノセンサ p130Cas は骨格筋のメカニカルストレス適応に関与しない. 第 67 回日本体力医学会学術総会, 岐阜, 2012.9.

沢田秀司, 今有礼, 和田正吾, 鈴木康弘, 牛田多加志, 鈴木克彦, 秋本崇之. 一過性レジスタンス運動が血中マイクロ RNA のプロファイルに及ぼす影響. 第 67 回日本体力医学会学術総会, 岐阜, 2012.9.

Wada S, Russell AP, Kato Y, Ushida T, Akimoto T. MiR-23a targets PGC-1 and regulates mitochondrial content in skeletal muscle. *APS Meeting Integrative Biology of Exercise*, Westminster, 2012.9.

秋本崇之. 骨格筋可塑性における miR-140 の機能. 第 1 回骨格筋生物学研究会, 大阪, 2013.3.

秋本崇之. 骨格筋可塑性に関わるマイクロ RNA. 第 5 回分子骨格筋代謝研究会, 京都, 2013.6.

Wada S, Kato Y, Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, Schiaffino S, Asahara H, Ushida T, Akimoto T. Translational suppression of atrophic regulators by miR-23 integrates resistance to skeletal muscle atrophy. 35th Naito conference, Sapporo, 2013.7 (invited).

秋本崇之. メカニカルストレスと細胞分化. 第 21 回日本運動生理学会, 川越, 2013.7(invited).

秋本崇之. 運動によるヘルス・ベネフィットに関する骨格筋マイクロ RNA. 立命館大学総合科学技術研究機構生活習慣病治療の最適化プロジェクト. 草津, 2013.8(invited).

Akimoto T, Ushida T. Mechanical stretch maintains Nanog expression through PI3K/Akt signals in mouse embryonic stem cells. 第 68 回日本体力医学会学術総会, 東京, 2013.9.

Suzuki K, Sugama K, Yoshitani Y, Shiraishi K, Kometani T, Miura S, Yoshioka H, Mori Y. Assessment of neutrophil functional activity following prolonged endurance exercise. 11th Symposium of the International Society of Exercise and Immunology, Newcastle, Australia, 2013. 9.

Sako H, Suzuki K. Genome-wide translational profiling of the inflammatory response of macrophage to LPS. International Society of Exercise and Immunology, Newcastle, Australia, 2013. 9.

Lee M, Kawanishi N, Yada K, Hung Y, Mizokami T, Niihara H, Suzuki K. Changes of cytokines in mouse skeletal muscle and plasma by a single bout of exercise. International Society of Exercise and Immunology, Newcastle, Australia, 2013. 9.

Sugama K, Suzuki K, Yoshitani K, Shiraishi K, Kometani T. Changes of thioredoxin, oxidative stress markers and inflammatory responses after prolonged endurance exercise. 11th Symposium of the International Society of Exercise and Immunology, Newcastle, Australia, 2013. 9.

Sako H, Suzuki K. Global and unique translational regulation suggests a novel regulatory mechanism of the inflammatory response to LPS in macrophages. International Sport Sciences Symposium on "Active Life", Tokyo, Japan, 2013. 11.

Sako H, Suzuki K. Genome-wide translational analysis reveals the impact of global translational dynamics in the early inflammatory response in macrophages. EMBO workshop Complex Systems in Immunology, Biopolis, Singapore, 2013. 12.

Sako H, Suzuki K. Genome-wide translational analysis discovered the unique translational regulation independent of mRNA levels in the early inflammatory response of macrophages.

GTC Cytokines & Inflammation, San Diego, U.S.A., 2014. 1.

Akimoto T. MicroRNAs in muscle plasticity. Brain Korea 21 plus conference in Dankook University. Cheonan, 2014.6 (invited).

秋本崇之, 和田正吾, 加藤義雄, 沢田秀司, 相澤勝治, 朴鐘薫, 牛田多加志. MicroRNA-23a は持久性運動による筋適応に関与しない. 第 69 回日本体力医学会学術総会, 長崎, 2014.9.

佐古博皓, 鈴木克彦. 翻訳動態の網羅的解析が明らかにする新しい可能性. 第 69 回日本体力医学会学術総会, 長崎, 2014.9.

Akimoto T. Effect of exercise on oral immune function. MediSports conference in Dankook University. Cheonan, 2014.11 (invited).

Akimoto T. Young researchers lead the way in Sports Science. Brain Korea 21 plus conference in Dankook University. Cheonan, 2014.11 (invited).

Sako H, Suzuki K. Discover the sophistication of translational regulation. B³ Symposium, Brisbane, Australia, 2014. 11.

〔図書〕(計 3 件)

秋本崇之. 感染防御. (分担執筆: 宮村実晴編). ニュー運動生理学. 真興交易, 東京, 2014.

鈴木克彦. サイトカイン. (分担執筆: 宮村実晴編). ニュー運動生理学. 真興交易, 東京, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

秋本崇之 (AKIMOTO, Takayuki)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 00323460