

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18451

研究課題名(和文) 老化関連メタボライト探索によるWell-Ageing達成の挑戦的研究

研究課題名(英文) Innovative search of well-ageing related metabolites

研究代表者

近藤 祥司 (Kondoh, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80402890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：健康な若者4名の58時間絶食時の血液メタボローム網羅的解析の結果、120近いメタボロームの網羅的解析により、実に44のメタボライトが上昇し、我々の予想より遥かに代謝活性化が起こることが判明した(Teruya et al. Scientific Rep. 2019)。一方、有意に減少するメタボライトは2つであった。これら44の上昇メタボライトの中には、従来よく知られるケトン体、カルニチン、分子岐アミノ酸などの飢餓マーカー14個以外に、TCA回路系、抗酸化系、プリン・ピリミジン系など、新規発見も含まれていた。さらに、メタボライト網羅的解析(n=19)で、15のフレイルマーカー同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基礎老化研究で長年カロリー制限仮説が注目されてきたことに鑑み、ヒト飢餓メタボローム解析を行い、44個のメタボライト上昇という意外な成果を得た。発表論文は、2019年の約2万本のScientific Reportsジャーナル論文の中で、ダウンロード数のトップ100にランクインした。本成果は、飢餓による健康効果の臨床応用の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：During human fasting, metabolic markers, including butyrates, carnitines, and branched-chain amino acids, are upregulated for energy substitution. We performed non-targeted, accurate semiquantitative metabolomic analysis of human whole blood, plasma, and red blood cells during 34-58 hr fasting of four volunteers. During this period, 44 of 130 metabolites increased 1.5 to 60-fold. Consistently fourteen were previously reported. Metabolites in pentose phosphate pathway are abundant, probably due to demand for antioxidants, NADPH, gluconeogenesis and anabolic metabolism. Global increases of TCA cycle-related compounds reflect enhanced mitochondrial activity in tissues during fasting. Enhanced purine/pyrimidine metabolites support RNA/protein synthesis and transcriptional reprogramming. Thus diverse, pronounced metabolite increases result from greatly activated catabolism and anabolism stimulated by fasting. Anti-oxidation may be a principal response to fasting.

研究分野：老年医学

キーワード：老化 メタボライト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

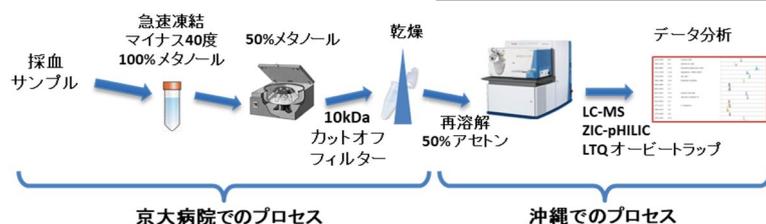
現在本邦は生命長寿と少子化が同時進行し、世界唯一高齢化率 25%超の国である(2014年)。2050年に多くの国が 25%超となるグローバル高齢化の中(WHO 推計)、日本は「老化先進国」として「超高齢社会」の最先端課題「老化の多様性」に今直面する。その実態は、寝たきりやフレイル(虚弱)増加の一方、健康長寿者や百寿者増加(2012年 5万人超、厚労省)と言う「高齢者の多極化」である。多くの疾病で「若年は均一で高齢(老化)は多様化する」現象が観察される一方、単一細胞解析で若年は均一だが高齢で発現がバラつく遺伝子群が確認された(Bahar 他 Nature06)。近年基礎老化研究では、時間軸に関係なく様々なストレスで老化は加速する事(ストレス老化)も判明した。つまり複合的外的因子により老化にも個人差が予想され、年齢や時間軸を基準とした「老化」定義はもはや現状に合わない点が問題を複雑化している(近藤監訳「老化生物学」2015)。最近 10年間で従来の疾患・臓器別の濃密な治療が「健康寿命と生命寿命のギャップ(約 10年)」を改善できない中、多様性を生かした医療や社会再構築が最重要課題となる。

その深い理解のため、我々は「寿命の進化論的考察」を提唱している。進化上、人類の寿命は 50歳までしか内的プログラムされず、「70~80歳以降の高齢者の多様性」は外的因子(環境や食事、生活習慣等)の結果と推測できる。今後超高齢社会では、「老化は絶対悪ではなく、少なくとも必要悪」として寛容に受け止め、「老化の多様性を人類の進化の証」として共感する姿勢が重要である。さらに進化上の獲得形質は、加齢によりむしろ個体に負に働く事が最近判明した。もし「老化は進化のトレードオフ」ならば、高齢者は若年時の生理的恒常性とは別の生存戦略(我々は「老化恒常性」と呼ぶ)を獲得しなければ、健康維持できない可能性がある。「老化恒常性」獲得度の違いが「高齢者の多様性」の原因かもしれない。個々の「老化恒常性」維持は、超高齢社会でバランスの良い Well-Ageing として期待される。

「老化の多様性と恒常性」解明の鍵は、最新老化研究の成果の一つ「老化の両面性」であろう。様々な「老化の両面性」が重なり合い、「老化の多様性」を形成し、その絶妙なバランスが老化恒常性維持し、逆にその破綻は加齢疾患・フレイルへと通じる可能性がある。もし化学的又は遺伝学的に、その「両面性・多面性」を Molecular Dissection「分子解剖」できれば、「正の側面」を温存し、「負の側面」除去が可能になる。最新基礎老化研究の成果を活かした、「老化」そのものに対する斬新なアプローチと呼べる。

長年の老化研究の成果として、「分子解剖」の標的となる代謝因子を我々は見出した。ヒト血液メタボローム解析による老化マーカーとなる新規メタボライトである。メタボロームとは、細胞が活着している間に合成・代謝する非常に小さなメタボライト(代謝物)成分(低分子)を、マススペクトロメトリー応用する事により網羅的に計測する最先端技術である。最新の研究では、メタボロームにより新規腫瘍マーカー等の発見(Nature2009)が報告され、非常に将来性有望な先端技術である。今後、フレイル・寝たきり予防への新しいアプローチとして、高齢者や老化を規定する新規マーカーや代謝産物の同定が、重要な課題となる。

図1 メタボローム解析



126 個のメタボライトに関し、我々の血液・赤血球メタボローム解析を用いて、30名の健康な参加者の朝絶食時のメタボローム解析を行った(図1)。その結果、ヒト若年(15名、平均 20歳代)・高齢群(15

名、平均 80歳代)の血液メタボローム比較し、14個の老化マーカーの同定に成功した。そのうち、3個は既報があり、残りの 11個は、我々による新規報告であった。14個のうち、6個は赤血球に豊富なメタボライトであり、我々のアプローチの重要性が再確認できた。それらは、抗酸化物質や筋肉系、窒素代謝系物質や、腎機能関連のメタボライトであり、老化と深く関与するメタボライトの報告となった。興味深いことに、これら 14個の老化関連メタボライトは、相関係数解析により、大きく二つのグループに分かれることが見いだされた。このような高齢者特有のメタボライトは、年齢以外に、食生活、生活様式、健康状態、環境要因などを反映すると推測される(ハレキツ他 PNAS 2016, 近藤,柳田 PNAS 2016)。これらの成果は、代謝の観点からの独創的な老化研究として国内外で大きく評価された(14か国のマスコミで報道)。

2. 研究の目的

「老化恒常性」に深く関与する我々の老化関連メタボライトの知見を、化学・遺伝学的「分子解剖」し、その成果の臨床応用還元を目指す。

3. 研究の方法

具体的には、以下の 2本柱とした。

- メタボローム解析を用いた飢餓適応による新規関連代謝物質の同定
- メタボローム解析によるヒト血中新規フレイルマーカー探索

4. 研究成果

まず、飢餓応答に関する成果

我々は最先端技術メタボロームで、老化メタボライトを報告してきた（ハレキス他 PNAS 16, 近藤他 PNAS 16）。我々は独自のアプローチを追求し、全血（Blood）、血漿画分（Plasma）、血球画分（RBC）の3種について分析を行う手法を確立した。この技術を用いて、飢餓応答の血液メタボローム解析を行った。古くからの老化仮説として、「カロリー制限仮説」も代謝に注目した老化仮説の一つである。摂取カロリーを70~80%に軽減すると、その寿命が約20%かそれ以上延長するという観察を端緒とする（Mckay, 1934年）。この寿命延長効果は、マウス、ハエ、線虫、魚、クモなど、多くのモデル生物で再現性よく観察される。カロリー制限により、サーチュイン、AMPKキナーゼ、FOXO転写因子などのシグナル応答が活性化され、寿命延長効果に結び付くと考えられる。興味深い事に、FOXO転写因子の重要な標的の一つは、ラジカスルカベンジャー遺伝子群であり、実際カロリー制限により、酸化ストレスの低減が観察される。奇しくも、「カロリー制限仮説」でも酸化ストレスの重要性が再認識されつつある。しかし、「カロリー制限仮説」の健常ヒトでの検証は、非常に困難である。

一方で飢餓環境に関して、ヒトは耐性であり、マウスは非常に脆弱であることがよく知られている。従来、ヒト飢餓時には、ケトン体、カルニチン、分子岐アミノ酸などの上昇が、エネルギー補給に重要と考えられていた（図2）。我々は、ヒト飢餓応答時の血液メタボローム解析により、その健康効果の何かヒントが得られるのではないかと考えた。よって、健常な若者4名の58時間絶食時の血液メタボローム網羅的解析を実施した。飢餓期間中、参加者の血糖値も低く保たれており、我々の試験プロトコルが従来の飢餓研究と同等に妥当であることが確認できた。

結果、120近いメタボロームの網羅的解析により、実に44のメタボライトが上昇し、我々の予想より遥かに代謝活性化が起こることが判明した（Teruya et al. Scientific Rep. 2019）。一方、有意に減少するメタボライトは2つであった。これら44の上昇メタボライトの中には、従来よく知られるケトン体、カルニチン、分子岐アミノ酸などの飢餓マーカー14個も含まれていた。それ以外に、TCA回路系、抗酸化系、プリン・ピリミジン系など、新規発見も含まれていた。

まず、TCA回路系メタボライトの上昇は、飢餓時の全身のミトコンドリア機能活性化を反映していると考えられた（赤血球にはミトコンドリアは存在しないため）。ケトン体、カルニチン、分子岐アミノ酸などの既知の飢餓反応とも合致する。一方、幾つ

図2 ヒト飢餓応答

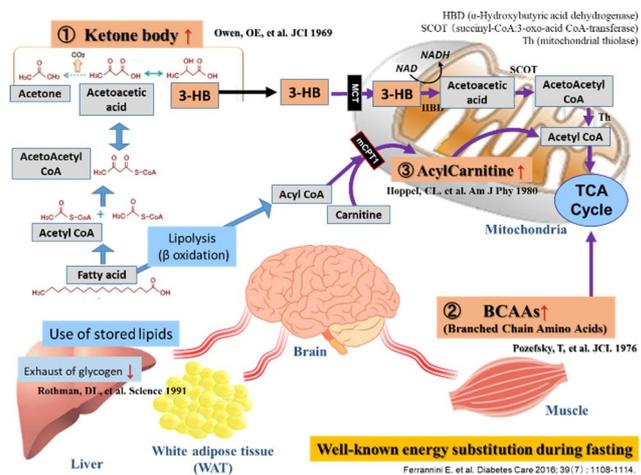


図3 新規飢餓マーカー

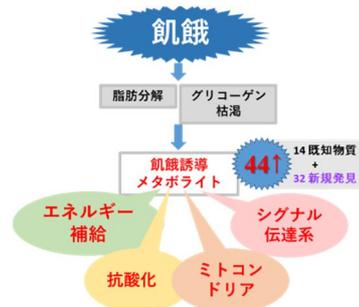
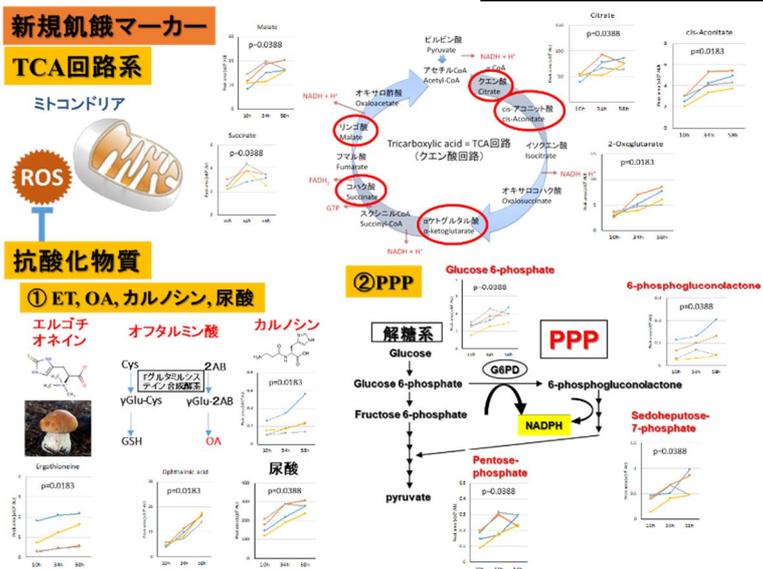


図4 抗酸化物質上昇

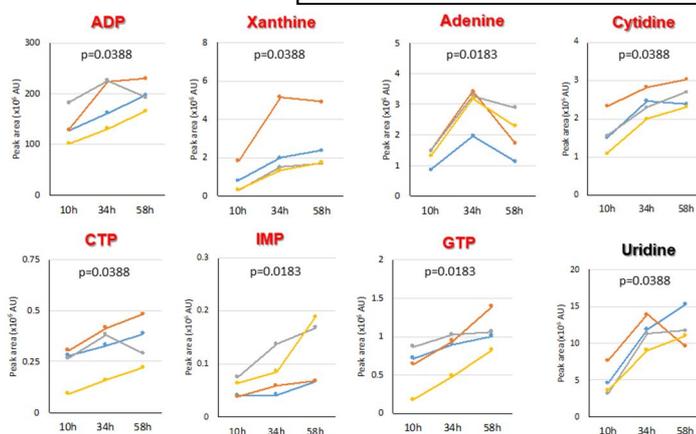
かの新規飢餓マーカー TCA回路系 ミトコンドリア ROS 抗酸化物質 ① ET, OA, カルノシン, 尿酸 エルゴチオネイン オフタルミン酸 カルノシン 尿酸



酸)が観察された。よって、飢餓時の重要なメタボライト上昇の意義の一つは、抗酸化力であると思われる。

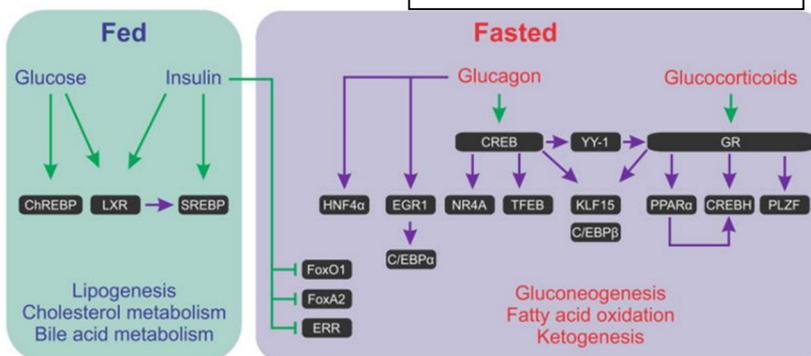
図5 プリン・ピリミジン系上昇

さらに、プリン・ピリミジン系メタボライトも、既報のあるウリジン以外に、多数上昇(ADP、CTP、GTP、IMP、キサンチン、アデニン、シチジン)が確認された(図5)。飢餓時には、転写リプログラミングにより多くの転写因子が活性化することが知られている(図6、Trends Endocrinol Metab. 2015)。さらに、3-ヒドロキシ酪酸や α -ケトグルタル酸(2-オキソグルタル酸)は、それぞれHDAC(ヒストンデアセチラーゼ)阻害効果、DNA・ヒストンデメチラーゼ活性化効果を通じて、転写制御するメタボライトとしても知られている。総合的には、飢餓時上昇メタボライトは、シグナル活性化効果も担う可能性がある。興味深いことに、先述の我々の見出した老化で低下する9つの低下メタ



ボライト群の中で、4つのメタボライト上昇(カルノシン、オフタルミン酸、ロイシン、イソロイシン)が確認された。飢餓反応が老化メタボライトを調節する可能性を示唆する。これら知見より、全血メタボローム解析の有用性が改めて確認された。

図6 飢餓時転写ネットワーク



次に ヒト血中新規フレイルマーカーに関する成果

フレイルメタボローム研究は他のグループより4報告がある(図7)。これらの対象は血清で、患者群も若く(平均60台から74歳)、n=60-200である。驚くべき事に、これら4報告の結論は、全くバラバラで一致しない(窒素代謝、食物系、vit E、男性ホルモン系等)。その理由は、別々の診断基準(Fried CHSかRockwood frail index)や独自のメタボローム法(絶食なしやGC-MS)にある(図5)。更に、FriedやRockwoodのフレイル診断基準はサルコペニアやADL評価に偏り、認知フレイルを見落とす可能性がある(Fried 2001, Rockwood 2005)。

図7 我々のプロトコールとの比較

フレイルメタボローム研究	診断法	平均年齢	サンプル	絶食	サンプルメタノール処理	主な結論
Marron et al. Metabolites (2019) (N=287)	SAVE (Fried CHS modified)	74.6	血漿	8時間以上	×	カルニチン減少、窒素系上昇
Pujos-Guillot et al. Frontiers in Physiol. (2019) (N=60)	Fried CHS プレフレイルが対象	71.3	血清		×	食物系(カフェイン類)
Ratray et al. Nature comm. (2019)	Frailty Index (Rockwood)	67.7	血清		×	ビタミンEなど
Livshits et al. PAIN (2018)	Frailty Index (Rockwood)	60.5	血漿	6時間以上	×	uridine, C-glycosyl tryptophan, N-acetyl glycine
我々のプロトコール	EFS		全血	12時間以上 オーバーナイト	○	

我々は認知と運動機能の両方がフレイルの重要ドメインと考え、フレイル診断時に、EFS(Edmonton Frail Score)、MoCA-J、とサルコペニア診断(筋力、SMI計測)も行った(倫理委認可済)。これにより、上記4報告との相違を論じる十分な科学的基盤形成が期待される。実際我々の先行の130メタボライト網羅的解析(n=19)で、15のフレイルマーカー同定に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4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 1) Takayuki Teruya, Romanas Chaleckis, Junko Takada, Mitsuhiro Yanagida and Hiroshi Kondoh.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Diverse metabolic reactions activated during 58-hr fasting are revealed by non-targeted metabolomic analysis of human blood.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36674-9.	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 近藤祥司、三河拓己、亀田雅博	4. 巻 76
2. 論文標題 老化とは	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床増刊号 老年医学(上)	6. 最初と最後の頁 109-113
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 近藤祥司	4. 巻 57
2. 論文標題 臨床に役立つQ&A 酸化ストレスと老化の関係について教えてください	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Geriatric Medicine (老年医学)	6. 最初と最後の頁 809-811
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 近藤祥司	4. 巻 34
2. 論文標題 老化の多様性の進化論的考察	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Diet Therapy 日本臨床栄養協会誌	6. 最初と最後の頁 47 - 52
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 近藤祥司、照屋貴之、柳田充弘	4. 巻 270
2. 論文標題 老化研究とメタボロミクス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 「医学の歩み」第一土曜特集 メタボローム解析 UPDATE	6. 最初と最後の頁 p380-5
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 無
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 近藤祥司	4. 巻 8
2. 論文標題 新健康概念「細胞老化・慢性炎症」を標的とする研究開発テーマ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「研究開発リーダー」	6. 最初と最後の頁 4 - 8
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 無
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 近藤祥司、照屋貴之、柳田充弘	4. 巻 15
2. 論文標題 メタボローム解析からの老化研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本抗加齢医学会『アンチ・エイジング医学』	6. 最初と最後の頁 42 - 47
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 無
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 近藤祥司	4. 巻 70
2. 論文標題 解糖系を標的とする創薬シーズ探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 p1-6
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 無
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12件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化・癌化におけるメタボライトと解糖系代謝研究
3. 学会等名 第60回日本老年医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化の多様性の進化論的考察
3. 学会等名 NR・サプリメントアドバイザーレベルアップセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化のメカニズムと最新の研究 - 進化論的考察より -
3. 学会等名 第48回栄養学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ヒト絶食による代謝シフトの網羅的解析
3. 学会等名 日本老年医学会近畿地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ワールブルグ解糖系代謝の新規分子制御メカニズムの解明
3. 学会等名 先端動物モデル成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化の多様性を規定する解糖系代謝恒常性の維持・変容・破綻による病態の解明
3. 学会等名 第61回日本老年医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ヒト絶食による代謝シフトの網羅的解析
3. 学会等名 第61回日本老年医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 ヒト絶食による代謝シフトの網羅的解析
3. 学会等名 日本動脈硬化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化はなぜ進むのか? ~テロメア、ストレス老化のメカニズム、アンチエイジング外来の実際~
3. 学会等名 第12回小児がん・脳腫瘍全国大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 Identification of the metabolites and glycolytic regulation
3. 学会等名 France-Japan Ageing workshop(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三河拓己、近藤祥司
2. 発表標題 解糖系酵素PGAMによる新規解糖系制御機構
3. 学会等名 第30回日本老年医学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤祥司
2. 発表標題 老化と対話する医療から新しい健康概念へ
3. 学会等名 第14回東京フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

老化とアンチエイジング研究室ホームページ
<http://www.anti-aging.jpn.com/>

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	横出 正之 (Yokode Masayuki) (20252447)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	