

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15661

研究課題名（和文）寝たきり予防に還元する包括的な代謝因子研究

研究課題名（英文）Comprehensive Metabolic Factor Study to Prevent Bedriddenness

研究代表者

亀田 雅博（Kameda, Masahiro）

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：40893574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：グローバル高齢化の中、寝たきり予防による健康寿命延伸が重要である。本研究はフレイル・サルコペニアなど老化関連疾患による転倒因子の解析の為に、LC-MSによる血液メタボローム解析を行った。結果、22のサルコペニアマーカーと10つの筋量マーカーを発見し、一部はミトコンドリアや腎機能と関連していた。サルコペニアマーカーが既報のフレイルマーカーと重複しなかったことは、それぞれの病態メカニズムの差異を示唆した。サルコペニアマーカーの大部分は腎不全で増加するメタボライトで、サルコペニアで低下していた。本研究は、転倒の原因になる老化関連疾患の病態理解を進展させ、寝たきり予防の為に診断や治療の発展に寄与した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では、寝たきり予防による健康寿命延伸の重要性が求められている。本研究では、質量分析器によるメタボローム解析により、転倒に関係するフレイル・サルコペニア因子と関連するメタボライトと、その生理的な関係性を発見した。この結果は、転倒予防のための診断、予後予想、臨床介入への基礎的知見の発展に寄与し、国民の健康増進延長の為に新たなシーズとして社会に貢献可能である。学術的には、本研究はフレイルとサルコペニアの病態の差と相動性を報告することでフレイルメタボロームの再整理に貢献した。また腎と筋肉代謝において新たな生理学的理解につながる結果を提示した。本研究はフレイルの病態理解の発展に寄与した。

研究成果の概要（英文）：Amidst the global aging population, the importance of preventing bedriddenness to extend healthy life expectancy is being emphasized. To contribute to the prevention of bedriddenness in the elderly, this study analyzed aging-related diseases such as sarcopenia using a mass spectrometer that can quantitatively measure small molecules non-targetedly, with a focus on fall-related factors. The study revealed 22 sarcopenia markers and 10 muscle mass markers, differences between frailty and sarcopenia metabolomes, a decrease in mitochondrial-related metabolites in sarcopenia-related metabolomes, a decrease in kidney function-related metabolites in sarcopenia-related metabolomes. The results of this study are expected to contribute to the pathophysiological understanding of aging-related diseases, which can cause falls. These findings have implications for the diagnosis, treatment, and intervention of aging-related diseases and could aid in the prevention of bedriddenness.

研究分野：内科学

キーワード：メタボローム フレイル サルコペニア 骨粗鬆症 転倒 軽度認知障害

## 1. 研究開始当初の背景

グローバル高齢化の中、要介護者増加が危惧されており、寝たきり予防による健康寿命延伸の重要性が求められている。本邦の要介護原因では「転倒骨折」が上位を占める一方で、後期高齢者での「フレイル」の増加が注目を集めている。「転倒骨折」の原因は、骨粗鬆症以外に、フレイル、サルコペニア、運動器症候群、多剤併用などの複数の病態・因子が複雑に関与している。しかしこれら、転倒骨折に関連する疾患群の基礎的な代謝基盤の共通点や違いは未知である。

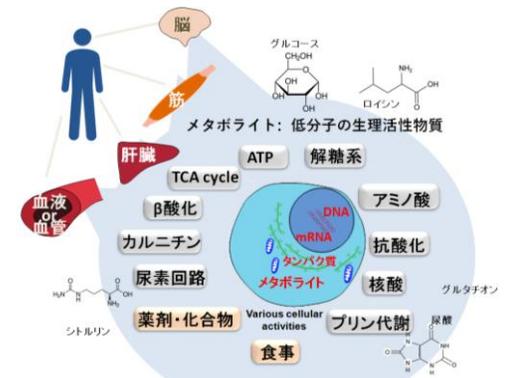


図1: 血液メタボローム

メタボライトは細胞が活着している間に合成・代謝する非常に小さな低分子代謝物・成分であり、この解析を行うことを「メタボロミクス」と呼ぶ(図1)。特に全身を循環する血液メタボロームは、遺伝、生活習慣、健康状態等を反映し、血液を通じて健康・老化・疾患状態の情報を読み取ることができる。これまでに酵母やヒトの代謝研究、日内変動、血液分画などの研究によりLC-MSを利用した全血メタボローム解析技術が開発され、臨床応用がなされてきた(参照1)。代表亀田は、整形外科医としての臨床経験と、近藤研究室における老年医学的メタボローム研究従事により、「転倒関連疾患の代謝の側面からの包括的理解と再定義」という課題を感じ研究を開始した。この結果、**2020年に22つのフレイル関連メタボライトを報告した**。同研究ではPCA解析により、フレイルメタボライトは研究対象を**機能的に分離可能なことが示唆**された(参照2、図2)。

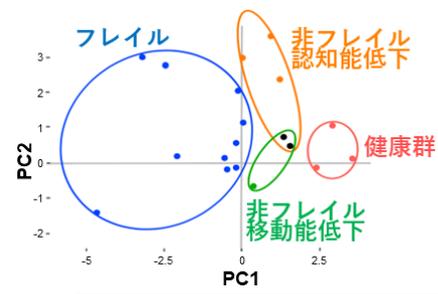


図2: フレイルスタディにおけるメタボロームPCA解析

## 2. 研究の目的

全血メタボローム解析により、サルコペニアや筋量低下など転倒に関する老化関連疾患における**代謝基盤解明**を目指すこと。

## 3. 研究の方法

研究方法の概要は、加齢性疾患の網羅的メタボローム解析とその検証である。サルコペニア、筋量低下といった加齢性の病態について、全血メタボロームの網羅的解析を行った。研究対象はフレイルスタディの参加者(19名、平均年齢84.0±6.9歳)で、血液サンプルと測定値はフレイルスタディで使用されたデータを再解析した(図3)。得られたデータについて転倒に関する病態(サルコペニア・筋量低下)に関し、統計学的有意差検定、ピアソン相関係数などを多面的に行った。最終的に、各疾患群で有意差を認めるメタボライトや、筋量、筋力と相関が高いメタボライトを特定し、PCAやヒートマップ解析を行い総合的に解析した。

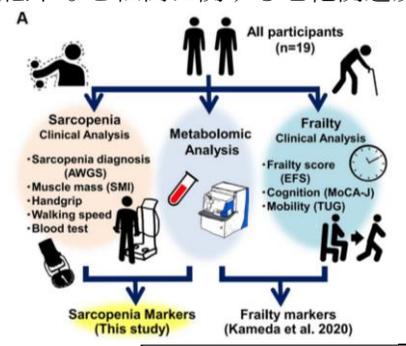


図3: 研究方法概要

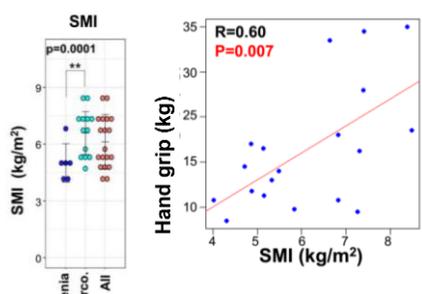


図4: サルコペニアスタディにおける身体パラメーター

## 4. 研究成果

### (1) サルコペニアマーカーの発見

サルコペニア群では非サルコペニア群に対して、**筋力量の評価値であるSMIは有意差をもって低下**しており、またこの集団全体ではSMIと握力は有意相関をしていた(図4)。この集団のメタボロームを解析したところ、サルコペニア群と非サルコペニア群で、有意差のある**22のサルコペニアマーカーを発見**した(参照3、図5)。サルコペニアマーカーは、**ミトコンドリア関連、腎機能関連、メチル化メタボライト**といった特徴を持っていた。2

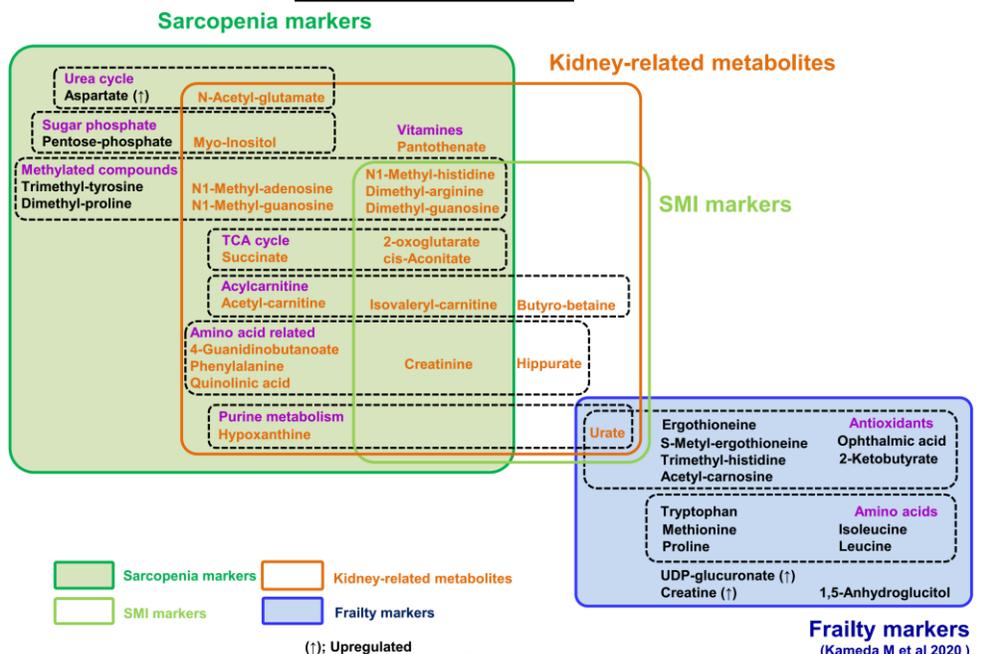


図5: サルコペニアマーカーと筋量マーカー

2のサルコペニアマーカーのうち、8つがミトコンドリアに関連しており(図6)多くは低下していたため、サルコペニアとミトコンドリア機能低下の関連が示唆された。最近の論文報告でもミトコンドリア機能低下とサルコペニアの関連が報告されており、合致する結果である。

## (2) 高齢者における筋量マーカーの発見

メタボローム解析の結果、SMI低下群とSMI非低下群を比較し、SMI低下群で有意差をもって低下していた10つの筋量マーカーを発見した。10つの筋量マーカーは8つがサルコペニアマーカーと重複していた(参照3、図5)。

サルコペニアマーカーと2020年度に報告したフレイルマーカーを図5としてまとめて提示しているが、驚くべきことに上記サルコペニアマーカーとフレイルマーカーを比較すると、重複するメタボライトが存在しない結果となった。この結果は、フレイルとサルコペニアが別の病態であることを示唆していた。

## (3) 考察

### ・フレイルとサルコペニアの差異

フレイルとサルコペニアの診断や病態において、相同性のある側面と、異なる側面が存在する。具体的には、サルコペニアは筋肉の量や質といった身体的な老化であるのに対して、フレイルは身体的老化の側面に加えて認知、社会、医療面など多面的な評価軸を持つ(図7)。ただしフレイルの診断方法によっては、身体的評価に重きを持つCHS基準などもあり、フレイル診断自体の代謝特性の評価やフレイルとサルコペニアといった疾患の代謝的な差に関する研究はこれまで厳密に行われてこなかった。

今回の研究対象集団では、フレイル群と非フレイル群においてはMoCA-Jは有意差をもってフレイル群で低下しており、フレイル診断スコアのEFSはMoCA-Jと有意相関も認めていた(図8左)。しかしながら今回のサルコペニア群の認知機能は、非サルコペニア群に対して有意差をもって低下しておらず、サルコペニアの指標の1つであるSMIもMoCA-Jと有意に相関をしていなかった(図8右)。つまり、フレイルは認知機能と相関をしていたが、サルコペニアに関連する指標では相関を認めなかった。このような集団を解析した結果、認知機能に関連するフレイルメタボライトは、サルコペニアマーカーに関与しなかったと推測された。

またPCA解析の結果では、サルコペニアマーカーによるサルコペニア診断(図7左図)はサルコペニア群と非サルコペニア群を分離可能なのに対して、サルコペニアマーカーによるフレイルの診断(図7右図)では、フレイルと非フレイル群を分離不可能であった。このPCA結果からも、サルコペニアとフレイルの代謝的な病態の差異が示唆された。

### ・フレイル関連マーカーとサルコペニア関連マーカーの生理的相動性

しかしながら、フレイルとサルコペニアでは認知機能面の評価の有無で診断の差異を認めるが、フレイル診断の身体的側面である筋量、筋力、歩行機能といった項目ではフレイルとサルコペニアは共通している。そこで、フレイルとサルコペニアが重複する生理的機能について考察を行った。

サルコペニアの有意差検定に加えて、SMIとの有意差検定では、筋量マーカーのUrateはフレイルマーカーでもあり、筋量とフレイルマーカーでのメタボライトの重複を認めた(図3)。またEFSとSMIの相関係数の解析を

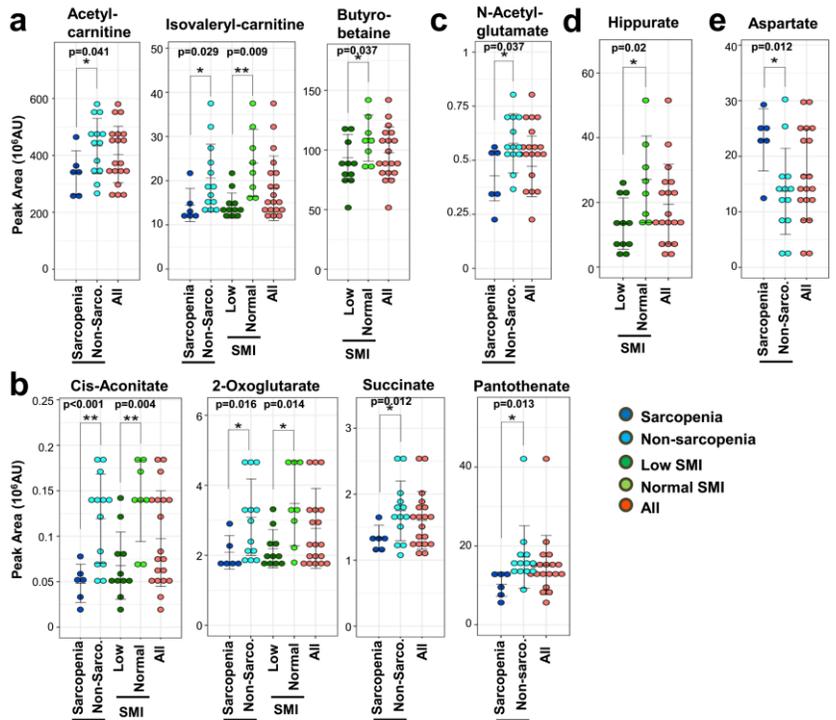


図6:サルコペニア関連マーカーでミトコンドリアと関連するメタボライトリスト



図7:フレイルの概念図

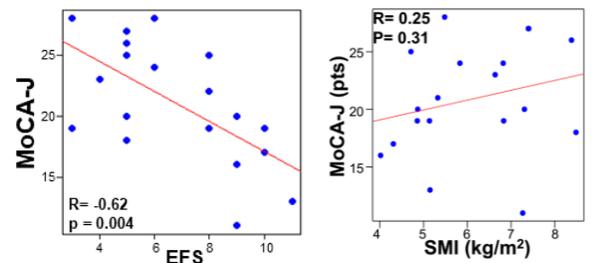


図8:認知機能とEFS, SMIとの相関

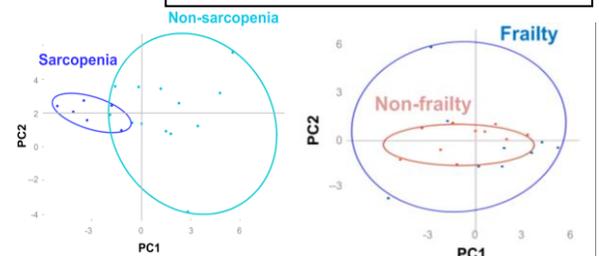


図9:サルコペニアマーカーによるサルコペニア診断(左)とフレイル診断(右)

追加で行ったところ、SMIマーカーである isovaleryl carnitine、hippurate は EFS と SMI の両方で有意相関があり、フレイル関連マーカーの acetyl-carnosine、1-5-anhydroglucitol、proline、methioine、leucine でも同様に EFS と SMI で有意相関を認めた (参照3、図10, 11)。サルコペニアマーカーとフレイルマーカーは、有意差検定では重複を認めなかったが、相関関係による解析を行うと、メタボライトの特性としては サルコペニア と フレイル で 共通する身体的機能に関連するメタボライトが存在すること が示唆された。

Parameters	SMI			EFS		
	R	95% CI	p value	R	95% CI	p value
Isovaleryl-carnitine	0.70	0.37 to 0.88	**0.001	-0.55	-0.80 to -0.12	*0.015
Urate	0.58	0.18 to 0.82	**0.008	-0.54	0.10 to 0.79	*0.02
Hippurate	0.60	0.21 to 0.83	**0.006	-0.46	-0.76 to -0.01	*0.05

図10:サルコペニア関連マーカーにおいて SMI と EFS の両方で有意相関したメタボライトリスト

Parameters	SMI			EFS		
	R	95% CI	p value	R	95% CI	p value
Isovaleryl-carnitine	0.70	0.37 to 0.88	**0.001	-0.54	-0.80 to -0.12	*0.015
Acetyl-carnosine	0.69	0.35 to 0.87	**0.001	-0.51	0.07 to 0.78	*0.03
Hippurate	0.60	0.21 to 0.83	**0.006	-0.46	0.01 to 0.76	*0.05
Urate	0.58	0.18 to 0.82	**0.009	-0.54	0.11 to 0.80	*0.02
1,5-anhydroglucitol	0.52	0.08 to 0.79	*0.02	-0.56	0.14 to 0.80	*0.01
Proline	0.49	0.05 to 0.77	*0.03	-0.54	0.11 to 0.80	*0.02
Methionine	0.46	0.01 to 0.76	*0.046	-0.56	0.14 to 0.80	*0.01
Leucine	0.46	0.01 to 0.75	*0.046	-0.46	0.01 to 0.75	*0.04

図11:フレイル関連マーカーにおいて SMI と EFS の両方で有意相関したメタボライトリスト

さらに、これらの共通するメタボライトを再度フレイル関連マーカーについて再解析をすると、筋量マーカーである isovaleryl carnitine と hippurate は 移動能低下マーカー であった (参照2, 4、図12)。同じくフレイル関連マーカーである acetyl-carnocine、proline、methioine、も 移動能低下マーカー と重複していた (図12)。

上記の結果は、フレイルとサルコペニアは異なる病態でありながら、個々のメタボライトにおいては身体的機能に関連する共通点が存在することを示唆していた。

・サルコペニアメタボライトの意義

腎機能とサルコペニアの関係は、腎機能低下によりサルコペニアが悪化することから、サルコペニアでは腎機能が低下していることが予想された。しかしながら予想と反し、サルコペニアマーカーの大部分は腎機能関連メタボライトであり、すべてがサルコペニアにおいて低下しており、見かけ上腎機能が改善するように観察された。腎不全患者への低タンパク質摂取療法にあるように、筋肉の代謝を低下させることは腎機能への負担を軽減させることが知られている。本研究からはサルコペニアマーカーの多くが筋肉の代謝物であり全体的な筋肉の代謝低下を呈しているか、もしくはサルコペニアでは腎機能低下によりメタボライトの腎排出が増加していることを示唆していた。当研究結果から、腎と筋肉代謝において新たな生理学的理解につながる可能性があり、今後のさらなる解析により発展が期待される。

・既報との比較

これまでのフレイルメタボローム研究では、各研究ごとに独立したメタボロームを報告しており (参照4、図13)、学術的に共通の結論に達することができていない状況であった。メタボライトの種類が論文によって異なるばかりか、メタボライトの増減までもが研究間で異なっていた。

上記原因としては、対照群の年齢の差、地域の差、プロトコルの差などが原因で共通の結論に達することができなかつたと推測された (参照4)。しかしながら今回我々は同じ集団において、フレイル、認知機能、歩行機能、サルコペニア、筋量低下といった異なる評価軸について、メタボローム評価を行った。前回のスタディでフレイル、認知機能、歩行機能の解析によりメタボライトの機能解析が可能であることが判明していたため (図12)、今回は同様の手法により解析を行った。この解析の結果、①サルコペニアマーカーと筋量マーカー、②フレイルとサルコペニアメタボロームの差異、③サルコペニアメタボロームと筋量低下メタボロームの重複、④サルコペニア関連メタボロームにおけるミトコンドリア関連メタボライトの低下、⑤サルコペニア関連メタボロームにおける腎機能関連メタボロームの低下、⑥筋量メタボロームと移動能低下メタボロームの重複を発見・報告し、転倒に関係する因子であるフレイル、サルコペニア、筋量低下、移動能低下に関連するメタボライトとその関係性を発見することにつながった。

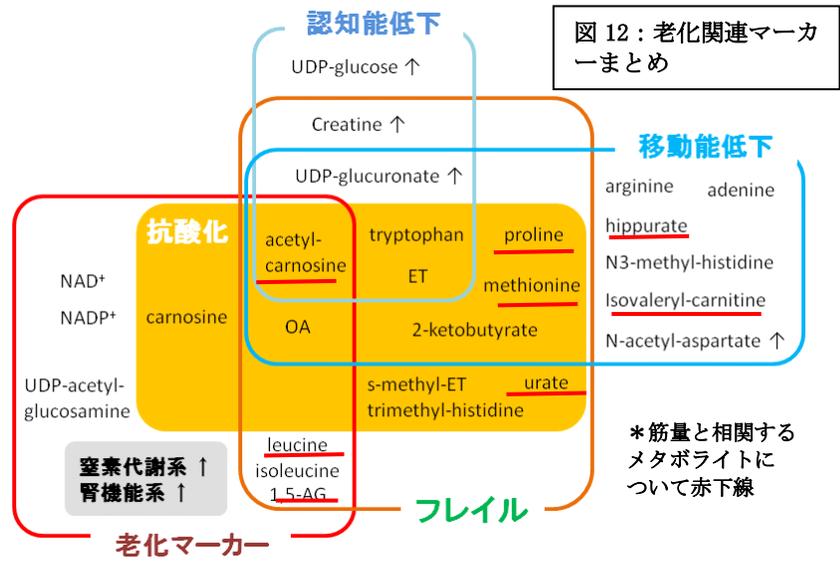


図12:老化関連マーカーまとめ

図 13 : フレイルマーカー既報

Report	抗酸化	アミノ酸	カルニチン	プリン代謝	尿素回路・腎機能	クエン酸回路	糖類	グルクロン酸
Adachi Y. et al.(2018)		(↑) グルタミン酸 (↓) チロシン、ヒスチジン、イソロイシン ロイシン、リジン、メチオニン フェニルアラニン、スレオニン トリプトファン、バリン						
Pujos-Guillot E.et al. (2019)		(↑) グルタミン酸、スレオニン	(↑) C5 カルニチン				(↓) マンノース	
Maron M. et al (2019)		(↓) トリプトファン、ロイシン メチオニン、チロシン ヒスチジン、アスパラギン	(↑) C4 カルニチン	(↑) 尿酸	(↑) クレアチニン ジメチルアルギニン	(↑) フマル酸 マロン酸		(↑) グルクロン酸
Rattray N. et al. (2019)	(↓) γ-トコトリエノール	(↑) Dトリプトファン	(↓) 6つの長鎖 カルニチン	(↓) ウリジン	(↑) アルギニン	(↑) クエン酸	(↑) D-グルコース (↓) ミオイノシトール	
Livshits G. et al. (2018)		(↑) グルタミン酸、プロリン	(↑) C4 カルニチン	(↑) 尿酸、ウリジン			(↑) マンノース	
Fazlzadeh P. et al. (2016)	(↓) カルノシン	(↓) ヒスチジン、セリン、グリシン チロシン、トリプトファン メチオニン、グルタミン酸	(↓) C0, C3, C5, C8 カルニチン			(↓) クエン酸		
Kameda M. et al (2020)	(↓) アセチルカルノシン オファサルミン酸 エルゴチオネイン	(↓) ロイシン、イソロイシン トリプトファン、メチオニン プロリン	(↓) C5 カルニチン	(↓) 尿酸				(↑) UDP- グルクロン酸

本研究により複合的な側面を持つフレイルについてのメタボライトを生理的に分類し、身体的機能に基づき、生理的に共通するメタボライトと共通しないメタボライトについて報告を行った。上記結果は、各フレイルメタボライトに生理的意義を付加することで、これまで報告されたフレイルメタボロームの整理につながった。この結果は、転倒の原因になるフレイル、サルコペニアを含む老化関連疾患の病態把握の発展に大いに寄与すると考える。またメタボライトの機能的分解は、将来的なフレイルやサルコペニアにおける早期診断やその臨床応用にも寄与する研究に展開可能である。その為、今後は研究のスケールアップ、メタボライトの直接的な生理的活性の検証、老化関連メタボライトによる臨床介入試験などのさらなる研究による検証が必要であり研究の継続が求められる。

本研究では今回の研究期間では、サルコペニア以外の疾患のメタボローム、メタボライトの基礎的な解析、臨床介入試験による臨床応用については時間とリソースが不足し研究成果報告まで漕ぎつかなかった。本研究は、これらのフレイル関連マーカーの直接的な生理活性の解析、メタボライトの臨床応用についてさらなる研究展開により、寝たきり予防に寄与しうる健康寿命延伸効果の実証につながることで、健康科学分野の発展とその社会還元にも今後さらなる貢献しうると考える。

参考文献

- 1) Chaleckis R, Murakami I, Takada J, Kondoh H, Yanagida M Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences Proceedings of the National Academy of Sciences 113(16) 4252-4259 2016
- 2) Kameda M, Teruya T, Yanagida M, Kondoh H, Frailty markers comprise blood metabolites involved in antioxidation, cognition, and mobility Proceedings of the National Academy of Sciences 117(17) 9483-9489 2020
- 3) Kameda M, Takayuki Teruya, Mitsuhiro Yanagida, Hiroshi Kondoh Reduced uremic metabolites are prominent feature of sarcopenia, distinct from antioxidative markers for frailty Aging 2021
- 4) フレイルのバイオマーカー研究の展望 亀田 雅博, 近藤 祥司, 日本老年医学会雑誌 58(3) 333-340 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 亀田 雅博、近藤 祥司	4. 巻 58
2. 論文標題 フレイルバイオマーカー研究の展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本老年医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 333 ~ 340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3143/geriatrics.58.333	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 Kameda Masahiro、Teruya Takayuki、Yanagida Mitsuhiro、Kondoh Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Reduced uremic metabolites are prominent feature of sarcopenia, distinct from antioxidative markers for frailty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 20915 ~ 20934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.203498	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 Kondoh Hiroshi、Teruya Takayuki、Kameda Masahiro、Yanagida Mitsuhiro	4. 巻 596
2. 論文標題 Decline of ergothioneine in frailty and cognition impairment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1270-1278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14299	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

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 亀田雅博, 近藤 祥司
2. 発表標題 網羅的血液メタボロミクスにより同定したフレイルおよびサルコペニアマーカー
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀田雅博, 近藤 祥司
2. 発表標題 簡易版京都フレイルスケールKFSの開発
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀田雅博, 近藤 祥司
2. 発表標題 老化及び老年病基礎研究の進歩 全血を含む血液網羅的メタボロミクスによる、老化に関連するメタボローム研究: 老化、絶食からフレイル研究に至る知見より
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀田雅博, 近藤 祥司
2. 発表標題 網羅的血液メタボロミクスによるフレイル・サルコペニアにおける病態の相同性と差異
3. 学会等名 第8回日本サルコペニア・フレイル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀田雅博, 近藤 祥司
2. 発表標題 簡易かつ包括的な京都フレイルスケールの有用性
3. 学会等名 第8回日本サルコペニア・フレイル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Kameda, Hiroshi Kondoh
2. 発表標題 Blood frailty markers related to cognition and walking ability
3. 学会等名 13th International Meeting of Asian Rehabilitation Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀田雅博, 照屋貴之, 柳田充弘, 近藤祥司
2. 発表標題 Untargeted blood metabolome identified frailty and sarcopenia markers
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀田雅博, 近藤 祥司
2. 発表標題 全血メタボロミクスにより発見されたフレイルマーカーと移動能マーカー
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 亀田雅博, 近藤 祥司
2. 発表標題 網羅的全血メタボローム解析によるフレイルとサルコペニアの代謝差異の発見
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年～2023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
研究協力者	近藤 祥司  (Kondoh Hiroshi)  (80402890)	京都大学・医学研究科・准教授   (14301)	
研究協力者	柳田 充弘  (Yanagida Mitsuhiro)  (80025428)	沖縄科学技術大学院大学・G0細胞ユニット・教授   (38005)	

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