

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390168

研究課題名(和文) 地域住民を対象とした生活習慣病疫学研究におけるメタボローム・プロファイル解析

研究課題名(英文) Prevention of non-communicable diseases and metabolic profiling in a population-based cohort study

研究代表者

武林 亨 (Takebayashi, Toru)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30265780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：予防バイオマーカーを明らかにするのに有用であるメタボロミクスを地域在住者の疫学研究に導入するため、第一に測定条件等を確立し、次いでその手法を用いて、CE/MS法による血漿の網羅的代謝プロファイリングとライフスタイル因子との関連について疫学的に検討した。男性での解析の結果、27物質が、他のライフスタイル要因を調整した後も有意に飲酒と関連していた。また65歳未満の男性では、総身体活動量との間に6物質が有意な関連を示した。また生活習慣の異なる地域間を比較するための分析も行った。今後は、さらなるデータセットの蓄積によるreplication解析の実施およびコホート集団の追跡による検討を予定している。

研究成果の概要(英文)：CE/MS-based metabolome profiling was applied to a population-based epidemiologic study. Stable analytical procedures was first established, and then relationships between plasma metabolic profiling and lifestyle factors were examined in men. 27 metabolites were significantly related to alcohol drinking, and 6 were associated with total physical activity. Data set for 3 cohorts from different regions was completed. Further study is planned for follow-up and replication analysis.

研究分野：疫学、予防医学

キーワード：メタボローム コホート バイオマーカー 飲酒 身体活動

1. 研究開始当初の背景

日本人の生活習慣病の罹患・死亡パターンは、1950年代以降の疾病構造の変化とともに大きく変化してきたが、依然、明らかな地域差がある。循環器疾患のうち脳血管疾患死亡率は、東北地方の各県でいずれも全国平均より高く、差は縮まりつつあるものの、依然、大阪、京都、滋賀などの関西地方では低い。こうした地域差の理由として、危険因子である血清コレステロール値や血圧値の違い、その背景にある脂肪、カロリー、塩分摂取等の栄養学的な要因や sedentary work やストレス等都市と農村の生活様式の違い、薬剤感受性や危険因子の進展を規定する遺伝子型の違いなど、多様な要因の関与が指摘されており、今後の予防戦略を進めるには、要因ごとではなくこれらを包括したシステムとしての理解が欠かせない。

近年の生命科学と分析技術の進歩は、環境要因と遺伝的要因の相互作用によって生じる疾患へのシステムとしてのアプローチを可能にし、いわゆるオミクス研究が精力的に行われるようになった。ゲノムについては、全ゲノム関連解析を用いたゲノム疫学研究へと進展しつつあるが、ゲノム情報とフェノタイプとの間にはギャップがあることから、疾病機序により密接に関連したアプローチの必要性が指摘されている。メタボロームは、生体内の低分子化合物や代謝産物で、内因性には約 3000 物質あると推測されており、環境要因による代謝過程への修飾も反映するので、メタボローム解析で血液中あるいは尿中のメタボロームを網羅的かつ定量的に測定することは、疾患機序そのものの理解と共に、その発症や予防に密接に関わる代謝産物を明らかにすることにつながる。疫学研究の領域でもメタボローム解析技術の導入が進みつつあり、生活習慣や危険因子を測定して疾患との関連を検討する従来型の疫学研究から、病態に基づいた新しいバイオマーカーの発見を伴う新しい疫学への展開が期待されている。

そこで、疫学研究チームとメタボローム解析チームの融合型研究組織を構築し、短時間・高感度の網羅的なメタボローム解析技術（キャピラリー電気泳動-質量分析装置、CS/MS 法および LC/MS/MS 法）の地域在住者のコホート研究への応用による大規模疫学研究を世界に先駆けて立ち上げる準備を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、山形県鶴岡市であらたに開始した地域在住者のコホート研究を中心とし、他の2つの地域コホートの協力を得て、3つの地域コホート研究参加者の網羅的メタボローム解析を行い、疫学研究に適用可能なメタボローム解析の手法を開発した上で日本人における地域在住一般集団のメタボローム・プロファイルの作成を進めること、メタ

ボローム・プロファイルとリスクファクターの関連について検討すること、生活習慣病罹患パターンが異なる地域住民のメタボローム・プロファイルの比較を行うこと、ならびにメタボローム・プロファイルの疾患バイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 疫学研究に適用可能なメタボローム解析手法の確立と地域在住一般集団におけるメタボローム・プロファイルの作成

わが国の地域在住者を対象として生体試料を用いてメタボローム解析を行った例はないことから、CE/MS 法による極性物質の網羅的解析について、検体の前処理および保存条件、標準物質の保存条件を明らかにするため、血清凝固時間、検体保存温度・時間といった条件を複数設定して、血清と血漿（EDTA-2Na 添加）の代謝物プロファイルの安定性の比較を行った。また、保存試料を用いて分析を行う可能性に備え、同一サンプルの血清、血漿、代謝物抽出処理済み血漿の3種類の試料について、凍結（-80℃）融解試験を最大 10 回まで繰り返して濃度変動を検討した。

こうして確立した方法を、2012年度より開始した山形県鶴岡市在住・在勤者を対象とした新しいコホート研究（鶴岡メタボロームコホート研究）の参加同意者から得られた血漿および尿検体に適用し、そのうちの 900 名のメタボローム解析を実施し、プロファイルを作成した。

(2) メタボローム・プロファイルとライフスタイルファクターの関連の検討

得られたメタボローム・プロファイルのうち、血漿のプロファイルを用いて、古典的なライフスタイルファクターである飲酒、身体活動との関連を検討した。ライフスタイルについては、コホート研究のベースライン調査で実施した自記式質問票から、飲酒習慣の有無、平均的飲酒量、総身体活動量、余暇の運動量について情報を得た。

飲酒については、頻度および標準的に摂取する酒の種類と量の回答より、我が国で一般的に消費される酒のエタノール濃度 [種類別] を用いて 1 日あたりの摂取量を算出し、摂取なしまたは 1g/day 未満の摂取者を飲酒なし群と定義し、それ以外を摂取量による 3 分位で低/中/高飲酒群に分類、飲酒量により分類した 4 群で、109 物質について分散分析を実施し、trend P を算出、BH 法の FDR により体重比較性を調整した（有意水準 0.05）。なお分布型に応じ対数変換を行った。

運動については、身体活動量でわけた 4 群において有意な線形傾向を示した物質について、共分散構造分析を実施し、年齢、BMI、飲酒、喫煙、摂取カロリーを調整した濃度の比較を行った。

(3) 生活習慣病罹患パターンが異なる地域住民のメタボローム・プロファイルの比較

循環器疾患のうち脳血管疾患および虚血性心疾患の罹患パターンが異なり、その背景にはリスクファクターの分布の違いが関与しているものの、生活環境や遺伝要因に規定された体内の代謝環境も影響していると考えられる。そのため生活習慣が異なる関西地方(滋賀県草津市、大阪府吹田市)の2つの地域コホートの協力を得て、性別、年齢、血圧レベルをマッチさせた計400人を選定した。

(4) メタボローム・プロファイル判別因子の疾患バイオマーカーとしての有用性の検討

飲酒に関連する健康影響として高血圧および肝機能障害、身体活動に関連する健康影響としてメタボリック症候群を取り上げ、判別分析を用いてメタボローム・プロファイルとの関連について検討した。

4. 研究成果

(1) 疫学研究に適用可能なメタボローム解析手法の確立と地域在住一般集団におけるメタボローム・プロファイルの作成

測定した70物質のプロファイルの比較では、全体として血清と血漿のプロファイルは良く一致したものの、両者に20%以上の差異のある物質も複数観察され、採血後直ちに4℃で保管して代謝物抽出処理を行った血漿が最も安定であった。一方、前処理まで常温で保管した場合、血漿であっても複数の代謝物の濃度が20%以上変動した。また凍結融解については、代謝物抽出処理済み血漿、血漿、血清の順に安定であった。以上のことから、疫学研究においては、採血後速やかに4℃に保冷した上で血漿を作成し、さらに可及的速やかに除蛋白等のメタボローム解析用前処理を進めた上で、-80℃に凍結保存することが最も望ましいと考えられた。また、測定機器の感度や標準物質の安定性を確認するためのQCサンプルを定期的に測定していくとともに、ピーク処理等データ処理の自動化・標準化も進め、多数の検体を安定的かつ効率的に処理しうる前処理・測定・化合物同定の手順の確立が不可欠であることが明らかとなった。以上の成果は、Electrophoresis誌に掲載予定である(in press)。

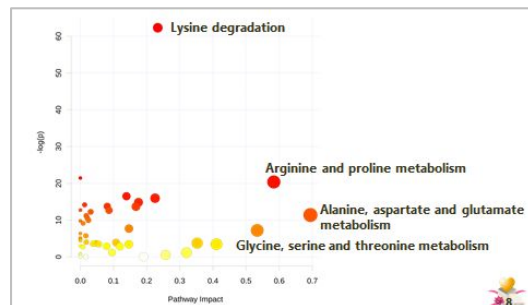
(2) メタボローム・プロファイルとライフスタイルファクターとの関連の検討

飲酒関連メタボローム・プロファイル

男性での解析の結果(女性は飲酒者が少ないため除外)、36物質が年齢調整後も、飲酒量と関連した(FDR $p < 0.05$)。このうち27物質は、他のライフスタイル要因を調整した後も $P < 0.05$ で有意な関連であった。また禁酒者の除外によっても結果は変わらなかった。また、結果の再現性を確認するため、別に実

施したメタボローム解析データを用いて replication 解析をおこなったところ、この27物質のうち19物質(70.4%)で有意な関連性が再現された。13物質は amino acid metabolism、3物質は carbohydrate metabolism、2物質は lipid metabolism に関連していた。アミノ酸関連代謝物質は、分枝鎖アミノ酸、トレオニン、グルタミンなど、多くの物質が、飲酒量と有意な関連であった。ROC分析を行ったところ、これら19物質のプロファイルによって、高飲酒者と非飲酒者を明確に判別することが可能であった(AUC 0.94, sensitivity 0.86, specificity 0.89)。

以下に、Metaboanalyst2.0によって実施した代謝パスウェイ解析の結果を示す。



身体活動関連メタボローム・プロファイル生産年齢人口である65歳未満の男性505名において総身体活動量とメタボローム・プロファイルとの関連について検討したところ6物質が、身体活動量と有意な関連を示した。Alanineを含む4物質は身体活動の増加とともに血漿濃度は低下し、Betaineほか2物質は増加していた。

(3) 生活習慣病罹患パターンが異なる地域住民のメタボローム・プロファイルの比較

2つの地域コホートから得た計400の空腹時尿のメタボローム解析ならびに鶴岡地域の300検体のメタボローム測定を実施、ピークの精査などを行って、3地域700名分のデータセットが完成した。

(4) メタボローム・プロファイル判別因子の疾患バイオマーカーとしての有用性の検討

飲酒と高血圧に関連するメタボローム・プロファイルの検討

飲酒量と有意に関連した代謝物について、さらに高血圧と関連する物質を検索したところ、8物質が有意な関連を示し、MetaboAnalyst2.0による代謝パスウェイ解析により、複数の代謝経路が飲酒に起因する高血圧に関連している可能性が示唆された(図2)。

今後は、さらなるデータセットの蓄積による replication 解析の実施およびコホート集団の追跡による検討を予定している。

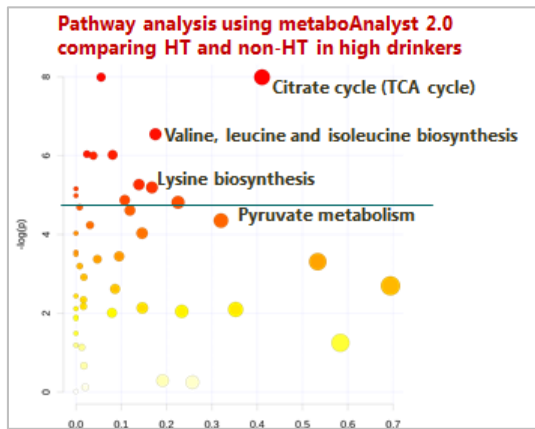


図2 飲酒に関連する代謝経路

飲酒と肝機能障害に関連するメタボローム・プロファイルの検討

飲酒量と有意に関連した代謝物について、さらに高血圧と関連する物質を検索したところ、8物質が血清 γ -GTP と有意に関連し、replication 解析によってそのうちの6物質が繰り返し有意であった。またこれらは、交絡しうる要因の調整によっても変わらなかった。とくに Threonine を含む4物質は、血清 AST と関連しており、飲酒に起因する肝機能障害を反映している可能性が示唆された。また、比を用いた指標では、Glutamate/glutamine 比が γ -GTP、AST、ALT と有意に関連していた。また、threonine を含む5代謝物を用いると、高飲酒者における肝機能障害の有無の判別が可能であった (ROC カーブの AUC 0.84、sensitivity 0.80、specificity 0.76)

身体活動とメタボリック症候群に関連するメタボローム・プロファイルの検討

身体活動量と有意な関連を示した6物質のうち、Pipicolate を除く5物質は、いずれにメタボリック症候群のリスク要因が1~3つ以上へと蓄積するに従って、要員数依存的に濃度が変化し、3項目以上メタボリック症候群に該当する群で最も濃度が高く (Betaine のみ低い) なっていたことから、身体活動によるメタボリック症候群の予防 (あるいは、不活発によるメタボリック症候群) に関わるバイオマーカーである可能性が示唆された。

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 1件)

(1) Hirayama A, Sugimoto M, Suzuki A, Hatakeyama Y, Enomoto A, Harada S, Kurihara A, Soga T, Tomita M, Takebayashi T. Comparison of charged metabolomic profiles in serum and plasma and their processing and storage conditions.

Electrophoresis (in press). 査読あり

[学会発表](計 14件)

(1) 原田成、武林亨、栗原綾子、深井航太、桑原和代、岡村智教、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝。加齢による代謝変化と血漿バイオマーカー：鶴岡メタボロームコホート研究。第85回日本衛生学会総会。2015年3月26-28日。和歌山県民文化会館(和歌山県和歌山市)

(2) Sei Harada, Toru Takebayashi, Ayako Kurihara, Miki Akiyama, Daisuke Sugiyama, Kazuyo Kuwabara, Ayano Takeuchi, Akiyoshi Hirayama, Masahiro Sugimoto, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. Metabolomic pathway analysis in a large population study reveals metabolic change by alcohol intake and hypertension. 第25回日本疫学会学術総会。2015年1月21-23日。愛知県産業労働センター(愛知県名古屋市)

(3) Toru Takebayashi, Sei Harada, Ayako Kurihara, Miki Akiyama, Tomonori Okamura, Yuji Nishiwaki, Taichiro Tanaka, Akiyoshi Hirayama, Masahiro Sugimoto, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. Accumulation of metabolic syndrome risk factors and plasma amino acids and their related metabolites: Tsuruoka Metabolomic Cohort Study. 10th Annual Meeting of Metabolomics Society. 2014 June 23-26. 東京第一ホテル鶴岡(山形県鶴岡市)。

(4) Sei Harada, Toru Takebayashi, Ayako Kurihara, Miki Akiyama, Daisuke Sugiyama, Kazuyo Kuwabara, Ayano Takeuchi, Akiyoshi Hirayama, Masahiro Sugimoto, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. Metabolomic profiling reveals novel biomarkers of alcohol-induced hypertension in community-dwelling men: Tsuruoka metabolomic study. 10th Annual Meeting of Metabolomics Society. 2014 June 23-26. 東京第一ホテル鶴岡(山形県鶴岡市)。

(5) 原田成、武林亨、栗原綾子、岡村智教、杉山大典、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝。血漿中メタボロームと採血前24時間以内の飲酒有無の関連。鶴岡メタボロームコホート研究。第84回日本衛生学会学術総会。2014年5月25-27日。岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

(6) 武林亨、原田成、岡村智教、栗原綾子、杉山大典、桑原和代、西脇祐司、田中太一郎、秋山美紀、竹内文乃、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝。地域在住者におけるメタボリック症候群要因の集積と血漿中アミノ酸の関連：鶴岡メタボロームコホート研究。第24回日本疫学会学術総会。2014年1月23-25日。民陵会館(宮城県仙台市)

(7) 原田成、武林亨、岡村智教、栗原綾子、杉山大典、桑原和代、西脇祐司、田中太一郎、秋山美紀、竹内文乃、平山明由、杉本昌弘、

曾我朋義、富田勝．メタボロームワイドアシエーション研究による習慣的飲酒に起因する肝機能障害のバイオマーカー探索．第24回日本疫学会学術総会 2014年1月23-25日．長陵会館(宮城県仙台市)

(8) 横山葉子、武林亨、原田成、岡村智教、栗原綾子、杉山大典、桑原和代、西脇祐司、田中太一郎、秋山美紀、竹内文乃、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝．高血圧に関連する血漿中メタボロームプロファイルの検討：鶴岡メタボロームコホート研究．第24回日本疫学会学術総会 2014年1月23-25日．長陵会館(宮城県仙台市)

(9) 栗原綾子、武林亨、原田成、岡村智教、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝．地域在住者の栄養摂取量と血漿中アミノ酸濃度の関連（鶴岡メタボロームコホート研究）．第60回日本栄養改善学会学術総会．2013年9月12-14日．神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

(10) Toru Takebayashi, Sei Harada, Ayako Kurihara, Miki Akiyama, Tomonori Okamura, Yuji Nishiwaki, Taichiro Tanaka, Akiyoshi Hirayama, Masahiro Sugimoto, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita.

Application of metabolomic analysis to a population-based, prospective cohort study: Design and sample preparation method Tsuruoka metabolomic cohort study. 9th Annual Meeting of Metabolomics Society. 2013 July 1-4, Glasgow(Scotland).

(11) Sei Harada, Toru Takebayashi, Ayako Kurihara, Miki Akiyama, Daisuke Sugiyama, Kazuyo Kuwabara, Ayano Takeuchi, Akiyoshi Hirayama, Masahiro Sugimoto, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. Plasma metabolomic profiling in community-dwelling adults: Metabolites related to alcohol intake and liver diseases Tsuruoka Metabolomic Cohort Study. 9th Annual Meeting of Metabolomics Society. 2013 July 1-4, Glasgow(Scotland).

(12) 原田成、武林亨、栗原綾子、岡村智教、杉山大典、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝．地域在住者の血漿中メタボロームと飲酒量の関連（鶴岡メタボロームコホート研究）第83回日本衛生学会学術総会 2013年3月24-26日．金沢大学鶴間・宝町キャンパス(石川県金沢市)

(13) 原田成、武林亨、栗原綾子、西脇祐司、秋山美紀、岡村智教、杉山大典、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝．地域在住者の血漿中メタボロームプロファイルの検討（鶴岡メタボロームコホート研究ベースライン調査）第23回日本疫学会学術総会 2013年1月24-26日．大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

(14) 武林亨、原田成、栗原綾子、西脇祐司、秋山美紀、岡村智教、杉山大典、平山明由、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝．メタボロ

ーム解析を疫学研究に導入するための基礎的検討（鶴岡メタボロームコホート研究）．第23回日本疫学会学術総会．2013年1月24-26日．大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ
<http://tsuruoka-mirai.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武林 亨 (Takebayashi Toru)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30265780

(2) 研究分担者

岡村 智教 (Okamura Tomonori)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00324567

西脇 祐司 (Nishiwaki Yuji)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：40237764

曾我 朋義 (Soga Tomoyoshi)
慶應義塾大学・環境情報学部・教授
研究者番号：60338217

(3) 連携研究者

富田 勝 (Tomita Masaru)
慶應義塾大学・環境情報学部・教授
研究者番号：60227626

秋山 美紀 (Akiyama Miki)
慶應義塾大学・環境情報学部・准教授
研究者番号：50439254

宮本 恵宏 (Miyamoto Yoshihiro)
独立行政法人国立循環器病研究センター・予防検診部・部長
研究者番号：10312224

杉本 昌弘 (Masahiro Sugimoto)
慶應義塾大学・政策メディア研究科・特任准教授
研究者番号：30458963

三浦 克之 (Katsuyuki Miura)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90257452

上島 弘嗣 (Hirotsugu Ueshima)
滋賀医科大学・学内共同利用施設等・特
任教授
研究者番号：70144483

朝倉 敬子 (Keiko Asakura)
東京大学・情報学環・助教
研究者番号：40306709

(4)研究協力者

栗原 綾子 (Kurihara Ayako)
慶應義塾大学・医学部・助教

原田 成 (Harada Sei)
慶應義塾大学・医学部・助教